

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E. A. P DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Construcción de dos vectores conteniendo un gen
inhibidor de tripsina unido al promotor de la β -
amilasa y agro-transformación de camote (*Ipomoea
batatas* Lam.)”**

TESIS

para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en Genética

AUTOR:

Boris Augusto Gutarra Castillo

Lima-Perú

2004

**A mi madre Luz con todo mi amor
por haber hecho de sus hijos hombres de bien**

A la memoria de mi padre Alcibíades

A mis queridos hermanos: Martín, Lena y María

A LESCATPor los años maravillosos

Agradecimientos

Al Dr. Dapeng Zhang, líder del proyecto de mejoramiento genético de camote del Centro Internacional de la Papa (CIP), por haberme dado la oportunidad de ampliar mi formación científica.

A mi asesora del CIP Giselle Cipriani con mucho cariño por su apoyo y amistad.

A mi profesores de la U.N.M.S.M especialmente a la **Mg.Sc Mery Suni** por haber contribuido en mi formación científica.

A **Máximo Fernández** por su apoyo y amistad.

A los Asistentetes del CIP: Jorge Benavides, Ana Panta, Matilde Orillo, Charo Herrera, Mercedes Ames, Luis Ñopo, Ida Bartolini, Genoveva Rossel por todo su apoyo desinteresado.

A Los técnicos Luciano, Domingo, Alex, Jose y Lucho

A mis Amigos de CIP “la comunidad en pleno” : Guillermo, Jose, Wilmer, Orlando, Lucho, Carlos, Dennis, Julio, Peter, Christian, y asociados: Patty, Ilanit, Monica, Cristina, Jessica, Doris, Vannia.,

A mis amigos de la Universidad: **Walter, Caro, Marco, Mariela, Jose** ,etc.

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I INTRODUCCION	3
II OBJETIVOS	5
III ANTECEDENTES	6
III.1 El cultivo del Camote	6
III.2 El gorgojo del Camote	7
III.3.1 El inhibidor de tripsina de Soja (SKTI)	9
III.4 Proteínas Digestivas en <i>Cylas spp</i>	10
III.5 El promotor de la β -amilasa del camote	12
III.6 Introducción de genes en plantas	13
III.7 Antecedentes del uso de inhibidores de proteasas en camote	20
IV MATERIALES Y METODOS	21
IV.1 Lugar de ejecución	21
IV.2 Materiales	21
IV.3 Métodos	32
IV.3.1 Caracterización y verificación de los Plásmidos empleados	32
IV.3.2 Construcción del vector pCIP36	35
IV.3.3 Construcción del vector pCIP37	39
IV.3.4 Construcción del pCIP38	43
IV.3.5 Análisis de los vectores obtenidos	43
IV.3.6 Transformación de <i>A.tumefaciens</i> con los vectores pCIP36 y pCIP37	44
III.3.7 Transformación de Camote (<i>Ipomoea batatas</i>)	50
V RESULTADOS	55
V.1 Caracterización y verificación de los Plásmidos empleados	55
V.2 Obtención de los plasmidos pCIP36, pCIP37 y pCIP38	58
V.3 Transformación de <i>A.tumefaciens</i> con los vectores pCIP36 y pCIP37	64
V.4 Evaluación de la transformación de Camote con el vector pCIP37	64
V.5 Análisis de datos	69
VI DISCUSIÓN DE RESULTADOS	70
VI.1 Caracterización de los plasmidos pCIP4 y pKTI-2	70
VI.2 Obtención de los plasmidos pCIP36 y pCIP37	70
VI.3 Transformación de <i>A.tumefaciens</i> con los vectores pCIP36 y pCIP37	71
VI.4 Evaluación de la transformación de camote con el vector pCIP37	72
V II CONCLUSIONES	74
VIII RECOMENDACIONES	75
IX REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	76

ANEXOS

ANEXO I:.....Medio de propagación de camote (MPB) y suplementos85

ANEXOII: Extracción de plasmidos de *E.coli* y obtención de bacterias recombinantes .87

ANEXO III Secuenciamiento de ADN: sistema fMOL (Promega).....92

AnexoIV Determinación de la temperatura de apareamiento de los iniciadores para amplificar el promotor de la β -amilasa.....95

Anexo V: Extracción de plasmidos de *A.tumefaciens* y obtención de bacterias recombinantes96

Anexo VI: Southern blot..... 98

AnexoVII: Transformación genética de camote.....99

Anexo VIII : Alineamiento de los genes *Kti3* y *skti-4*.....100

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
CIP	Centro Internacional de la Papa
GFP	Proteína verde de Fluorescencia
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactoside
dNTP	Desoxirribonucleósido
GUSAsta	enzima β -glucoronidasa
ORF	Open reading frame (fragmento de lectura abierto)
PCR	Polymerase chain reaction (reaccion en cadena de la polimerasa)
PSMF	Phenylmethysulfonyl fluoride
Rf	Relative mobility (Movilidad relativa)
SD	Shine-Dalgarno sequence (secuencia Shine Dalgarno)
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamide gel electrophoresis
SBTI	Soybean trypsin inhibidor (inhibidor de tripsina de soja recombinante)
SKTI	Kunitz trypsin inhibidor gene (gen inhibidor de tripsina de soja tipo kunitz).
35S	Promotor del Virus del Mosaico de la Coliflor
X-gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-acido glucoronico
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactoside.
KD	Kilodaltons
μ g	microgramo
μ l	microlitro
μ M	micromolar
ng	nanogramos

ABSTRACT

The use of the promoter gene for β -amylase of sweetpotato (*I. batatas*) may optimize the expression of the inhibitor gene of soja type Kunitz (SKTI) in the sweetpotato reserving root. Under this criteria, in this thesis, the design of two binary vectors, called pCIP36 and pCIP37 is described; both contain the gene *skti-4* (a family's member of SKTI genes) which is controlled by the β -amilase promoter; the use of one of them for an agrotransformation assay is also described.

In order to construct vector pCIP36, a cloning of sweetpotato β -amilase gene was performed in a small plasmid, pPCR-Script, it was extracted with convenient restriction sites, that allowed us to ligate the promoter with gene *skti-4*, which was previously cloned in binary plasmid pMOG800.

For vector pCIP37 construction, β -amylase promoter obtained via PCR was used; PCR was performed with primers that incorporated restriction sites to the promoter ends, then promoter was ligated into the binary plasmid pCAMBIA-1304 with the gene *skti-4*, verification was done by restriction analysis.

These plasmids were used to transform *Agrobacterium tumefaciens* (strain LBA4404) and strains containing plasmid pCIP37 were used in order to transform sweetpotato. Entire four weeks in vitro leaves of Tanzania cultivar were obtained, which were evaluated through expression of reporter genes mGFP5 and GUS^{Asta}.

RESUMEN

El gorgojo del camote del genero *Cylas* spp es la mayor plaga del camote (*Ipomoea batatas*). Su rendimiento puede verse afectado hasta en un 80%. Un rango de estrategias de control esta disponible, entre ellas, la tecnología de los cultivos transgénicos. La transformación del camote con inhibidores de serino proteinasas ofrece una nueva estrategia para desarrollar resistencia contra esta plaga. Estas proteínas se unen a las proteinasas en el intestino medio del insecto interfiriendo con su metabolismo. El espectro de inhibición del inhibidor de tripsina de soja (*Glicine max*) gen SKTI contra las proteasas del intestino medio del insecto es mayor que los inhibidores endogenos del camote. El uso del promotor del gen de la β -amilasa, del camote (*Ipomoea batatas*), podría optimizar la expresión del gen inhibidor de tripsina de soja del tipo Kunitz (SKTI) en la raíz reservante del camote, para controlar al gorgojo *Cylas* spp. Bajo este criterio, en la presente tesis, se describe el diseño dos vectores binarios, designados como pCIP36 y pCIP37, ambos, conteniendo el gen *skti-4* (un miembro de la familia de los genes SKTI) controlado por el promotor de la β -amilasa, y también, el empleo de uno de ellos para realizar un ensayo de agro-transformación. Para construir el vector pCIP36, se procedió a realizar un clonamiento del promotor del gen de la β -amilasa del camote, en un plásmido pequeño, el pPCR-Script, para luego salir de éste, con sitios de restricción convenientes, que nos permitieron ligar el promotor al gen *skti-4*, el cual fue previamente clonado, en el plásmido binario pMOG800.

Para construir el pCIP37, se utilizo el promotor de la β -amilasa obtenido mediante PCR, con iniciadores que nos permitieron incorporar sitios de restricción convenientes, a los extremos del promotor, para luego ligar simultáneamente, este, con el gen *skti-4* en el plásmido binario pCAMBIA 1304. Los plásmidos así obtenidos, fueron verificados mediante análisis de restricción.

Posteriormente, estos plásmidos, fueron utilizados para transformar cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 y enseguida cepas conteniendo el plásmido pCIP37 fueron utilizadas para agro-transformar camote, para ello, se utilizo como explantes hojas completas, incluyendo el peciolo (de 0.5 a 1 cm de longitud) de plantas in vitro, de 4 semanas, del cultivar Tanzania, obteniéndose posteriormente, callos potencialmente transgénicos, los que fueron evaluados mediante la expresión de los genes reporteros mGFP5 y GUS. Asta.

I INTRODUCCION

El camote (*Ipomoea batatas*. Lam) con mas de 135 millones de toneladas de producción mundial, constituye el séptimo cultivo más importante en el ámbito mundial, y tercero, en el rango en los países en desarrollo por su contribución como fuente de calorías en la dieta humana (FAOSTAT 1998 citado por Sosinski et al 2001. Este cultivo, se adapta bien a tierras marginales, además, por su alto contenido nutricional, constituye una excelente forma de combatir la desnutrición, en los países del tercer mundo. Este cultivo, se ve muy afectado por el ataque de plagas y enfermedades. Existen mas de 40 especies de insectos que atacan al camote, siendo los “gorgojos“ de las especies *Cylas formicarius* y *Euscepes postfaciatus* los más destructivos, en el ámbito mundial y nacional respectivamente (Chalfant, 1990; Prakash, 1994; Fonseca et al; 1994) debido a que el cultivo es atacado por la larva e insecto adulto (Chalfnat, 1990).A escala mundial, el gorgojo del genero *Cylas*, se encuentran ampliamente distribuido, a diferencia de otras plagas que están limitadas a una región o localidad, siendo África, el S.E Asiático, USA y el Caribe los sitios de mayor afectación. Las perdidas causadas en la producción mundial, por *Cylas formicarius*, están en el orden de del 60 al 80% (Prakash, 1994), Por otro lado, los programas de fitomejoramiento son extremadamente largos y dificultosos debido a las características en su propagación y en su composición genética En este contexto, la obtención de variedades de camote resistentes a *Cylas* spp, haciendo uso de la biotecnología para introducir genes de resistencia, constituye una buena alternativa para superar estas dificultades. La transformación genética del camote, con inhibidores serino proteinazas (PIs), ofrece una nueva estrategia para desarrollar resistencia contra el gorgojo del camote, y otras plagas relacionadas. Estas proteínas ligadas alas proteinazas, en el intestino medio, del insecto interfiere con el metabolismo de este, causándoles un retardo de su desarrollo y problemas de fecundidad, (Zhang, D., 1997). De ahí que el gen inhibidor de tripsina (SKTI), obtenido de semillas de soja (*Glicine Max* L.), sea considerado un buen candidato a usarse en programas biotecnológicos de mejoramiento de este cultivo. El uso de promotores específicos, para dirigir la actividad de algún gen que necesita ser expresado en un determinado órgano, ha demostrado su eficacia muchas veces, en técnicas de transformación de plantas, ya que así podemos regular la cantidad total, y la ubicación del producto expresado por el gen (Dodds et al., 1991). El uso del promotor del gen de la β -amilasa, una de las dos proteínas de reserva más importante del camote, podría optimizar la expresión de este gen en la raíz reservante (órgano más sensible al ataque de este insecto). De esta forma la expresión del gen SKTI (la proteína recombinante) sé dará principalmente en este órgano.

A pesar de que existen diferentes experimentos, donde se hace uso del promotor de la β -amilasa, dirigiendo la actividad de algún gen de interés, existe muy pocos donde este dirige la actividad del

algún gen inhibidor de proteasas, siendo el antecedente más cercano, el realizado por Espinoza en 1989, donde, se logró construir el vector binario pCIP 5 que contiene el gen inhibidor de quimi tripsina, regulado por el promotor de la β -amilasa del camote actualmente, este está, en proceso de evaluación. En este contexto, la construcción de los vectores binarios pCIP36 y pCIP37, así como la obtención de callos de camote putativamente transgénicos, constituye un aporte importante en la obtención de plantas transgénicas resistentes a *Cylas* spp.

II OBJETIVOS

I.1.1 Objetivo General

Construir dos vectores de transformación genética de plantas y realizar un ensayo de Agro transformación.

I.1.2 Objetivos Específicos

1. Construcción de dos vectores de transformación vegetal, pCIP36 y pCIP37, conteniendo el gen del *skti-4* y el promotor de la β -amilasa (caset $\beta Amy/skti-4$).
2. Transformación de *A.tumefaciens* con los vectores obtenidos.
3. Transformación de plantas de camote (*Ipomoea batatas*.Lam) cultivar Tanzania con la construcción pCIP37.
4. Evaluación de callos putativamente transgénicos.

III ANTECEDENTES

III.1 EL CULTIVO DEL CAMOTE

El camote se originó probablemente en algún lugar de la región comprendida entre la península del Yucatán en México y la desembocadura del río Orinoco en Venezuela (Austin, 1988). Actualmente, el camote, es cultivado en mas de 100 países y entre los tubérculos y raíces es el segundo en importancia después de la Papa blanca (Horton, 1987).

La clasificación taxonómica según el National Center for Biotechnology Information (NCBI) es el siguiente:

	Reino	:	Viridiplantae
	Subreino	:	Embryophyta
División	:	Magnoliophyta	
	Subdivisión		Angiospermae
	Clase	:	Magnoliopsida
	Subclase	:	Asteridae
	Orden	:	Solanales
	Familia	:	Convolvulaceae
	Genero	:	Ipomoea
	Sección:		batatas
	Especie:		<i>Ipomoea batatas</i> (L)Lam.

La composición química del camote unido a su alta producción, su gran adaptabilidad y su tolerancia al estrés ha hecho que este cultivo sea considerado de subsistencia en poblaciones que sufren hambrunas y calamidades. Las raíces frescas concentran entre 6-14% de azúcares que en el proceso de horneado o hervido puede alcanzar concentraciones aun más altas (Babu y Nambisan, 1990). Las raíces también concentran cantidades apreciables de aminoácidos como el Ácido aspártico y Glutámico y también vitaminas como la B1, B2, ácido pantoténico, piridoxina β -carotenos y vitamina A.

La mayoría de la producción del camote esta dirigida al consumo humano en forma fresca, principalmente en regiones como África, Asia y América Latina. Las raíces y el follaje también son utilizados como alimento para animales. En el Perú se cultiva aproximadamente 3000 hectáreas de

camote anualmente que esta destinada al consumo fresco, forraje para animales harina, puré y también en la producción de almidón y alcohol.

III.2 EL GORGOJO DEL CAMOTE

El gorgojo del camote de la especie *Cylas spp*, constituye la plaga de mayor importancia de este cultivo mundialmente, siendo *C.formicarius* (Fabricious) y *C.punticollis* (Boheman) los más destructivos, variando según las regiones. Estos, inicialmente fueron reportados en África (*C.punticollis*) e India (*C.formicarius*), posteriormente, se han esparcido hacia el Caribe, Norte América, Las islas del Pacifico, y el Sudeste de Asia, debido ala dispersión del camote.

III.2.1Ciclo Biológico de *Cylas spp*

El ciclo Biológico (Fig.1A), ha sido estudiado por Reinhard (1923), González (1925), Floyd (1942) Mullen(1981), Amargos (1935), Martínez(1958) y Ocano et al (1990) (citados por Cisneros y Alcázar., 2001). Este comienza, con el depósito de los huevos en los tallos, para que después de 5 a 6 días a 30°C emerjan las larvas, que son apodas, blancas, de forma cilíndrica de aproximadamente de 7.2 mm. Posteriormente, a una temperatura de entre 30°C, se forma una pupa exarata de 5.5 mm de largo, de color blanco amarillento con mandíbulas y ojos negros para que después de 6 a 9 días de lugar al adulto. El empupamiento, se produce dentro del tallo o en la raíz tuberosa en una celda que previamente prepara la larva. El adulto, emerge después de 1 a 3 días después de salir de la cobertura pupal. Cuando aun permanecen en la cámara pupal, su color es blanquecino o cremoso, pero luego, se endurece y adquiere la coloración y característica típica de la especie. Los adultos, se alimentan de cualquier parte de la planta, pero, solo ponen huevo en la parte basal de los tallos o en las raíces tuberosas, que quedan expuestos generalmente por el agotamiento del suelo. Las hojas y raíces, emiten sustancias volátiles que atraen a las hembras, estas, al alimentarse estimula la síntesis de nuevos atrayentes volátiles, que atraen un numero mayor de hembras. La larva abre galerías en las raíces tuberosas, al principio superficial, pero luego, se va profundizando (Fig. 1B) Cuando se acerca la madurez, la larva, se acerca a la superficie dejando solo una delgada lamina que lo separa del exterior, allí permanece hasta que emerge como adulto. Las actividades de los adultos (alimentación apareamiento y ovoposición) son fundamentalmente nocturnas. En condiciones de campo, considerando todos los estados de desarrollo del gorgojo, las poblaciones son más abundantes en las raíces tuberosas que en los tallos, y la mayoría de los individuos, se encuentran 15cm debajo del cuellos de la planta y 10cm sobre ella (Jansson et al 1990 citado por Cisneros y Alcázar., 2001)

III.2.2 Control del gorgojo del Camote

Un amplio rango de estrategias de control, han sido implementados contra el gorgojo del camote: siendo las importantes, el control cultural, la rotación de cultivos, control químico, control Biológico, y el Manejo Integrado de Plagas (MIP). Dentro de ellos, el MIP es que mejor resultados han dado, ya que este, comprende poner juntos diferentes estrategias de control, siendo por ende, superior a cualquier metodología individual. Un buen ejemplo del empleo del MIP, es la experiencia Cubana, que logro reducir el daño causado por *Cylas spp* de un nivel inicial de 40-50%, a 4-8% tan solo tres años después de haberse iniciado el programa. Esto permitió, también, reducir el empleo de insecticidas desde un numero de 10-12 empleados por estación en los años 1991/92 a cero en 1996. Sin embargo, el traslado de la experiencia Cubana a otras regiones, como el Africa Oriental, no dio los resultados esperados, debido principalmente a dos factores, el primero, es la practica cultural de los agricultores de estos lugares, que prefieren mantener almacenadas las plantas largos periodos en campo, debido a la necesidad que tienen de garantizarse de raíces frescas durante gran parte del año. Esto, hace inútil la aplicación los programas de MIP debido a que, no se puede realizar cosechas tempranas y sanación de los campos. La segunda razón para el fracaso del programa de MIP, es que en el Africa oriental la especie *C.puncticollis* y *C.brunneus*, son únicos en el continente, a diferencia de *C.formicarius* que esta ampliamente distribuido. Estudios básicos, revelan la diferencia en la biología de estos grupos donde la especie Africana, tienen feromonas sexuales especificas, de ahí que otras feromonas no sean efectivas, y los machos aseguran la fertilización y pueden mantenerse en el campo por largos periodos. Por otro lado, se sabe que, en muchos cultivos la incorporación de plantas genéticamente resistentes obtenidas mediante mejoramiento clásico, es la clave para un exitoso programas de MIP (Chalfant,1990). Los programas de mejoramiento genetico han obtenido buenos resultados en *C. puncticollis* pero no para *C. formicarius* (Villareal, 1982). Esto se debe a que , en el camote, pese a que la búsqueda de resistencia comenzó hace 50 años, las significantes fuentes de resistencia en camote y en especies salvajes relacionadas no ha sido ubicada. A esto hay que sumar el tamaño grande del genotipo por su naturaleza hexaploide (Montaldo, 1972) interactuando con el ambiente, su limitada producción de semillas, la auto incompatibilidad e incompatibilidad cruzada de algunas variedades, hacen muchas veces que el esfuerzo de mejoramiento sea envano.

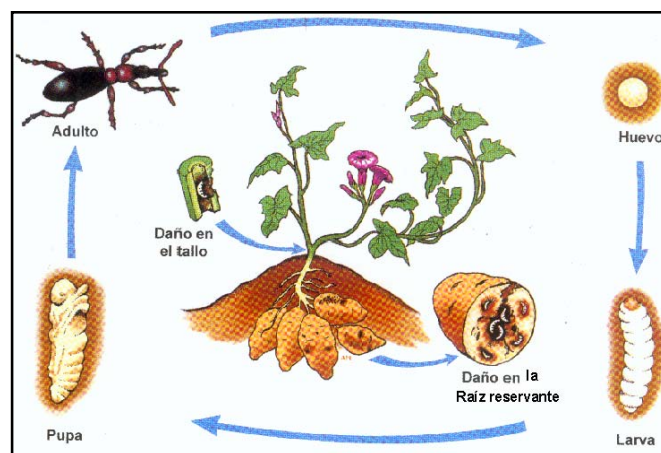
En este contexto, la Biotecnología aparece como un complemento, en el mejoramiento convencional de las plantas, convirtiéndose en una alternativa aprovechable, para introducir genes de resistencia al gorgojo del camote que de otra forma seria imposible lograrlo.

Desde los años 80, en que se inicio la transferencia de los genes de resistencia de *Bacillus thuringiensis* a diversas cultivos, la transformación genética de plantas, ha constituido una alternativa en la protección de cultivos. Esto también, ha sido demostrado en el caso del empleo de genes de resistencia de origen vegetal, como son los inhibidores de proteasas, que actúan como insecticidas (Hilder et al., 1987). Además, las plantas transgénicas que expresan insecticidas biológicos constituyen una forma más atractiva de controlar plagas de importancia (Yeh et al. 1997).

III.3 EL INHIBIDOR DE TRIPSINA DE SOJA (SKTI)

Los inhibidores de proteinasas, son proteínas que forman complejos con las proteasas, e inhiben su actividad proteolítica, constituyéndose así, en proteínas antinutritivas. El termino proteasas, comprende las endopeptidasas y exopeptidasas, mientras el termino proteinasas, solo comprende a las que tiene actividad endopeptidasas. Los inhibidores de proteínas son de peso molecular pequeño, usualmente de 5 a 25 kDa y son productos de familias multigénicas conservadas. Las familias de inhibidores, son específicas para cada uno de los cuatro mecanismos clásicos de actividad, de las enzimas proteolíticas que permite agruparlas en cuatro grande grupos: serina, cisteína, aspartico y metalo-proteasas.(Ryan,1990).

Dentro de los Inhibidores de serino proteinasas (PIs). El inhibidor de tripsina de soja (SKTI) de la familia Kunitz es la proteína prevalente en las semillas de soja (Ryan, 1990; Richardson, 1977; Ashis, 1999). Esta proteína fue cristalizada por primera vez por Kunitz el año de 1945, tiene un peso molecular de 21.500 kDa, un pH optimo de 7.0 un punto isoelectrico de 4.5 y esta compuesto por simple cadena polipeptidica cruzada por dos enlaces disulfuros (Kunitz 1945 citado por Wu y Scheraga.,1972). Estas proteínas tiene una especificidad mol por mol para la tripsina y en menor grado para la quimiotripsina. El mecanismo de inhibición de la proteasa comienza cuando se combina irreversiblemente con el sitio activo del inhibidor y este es convertido en una forma modificada “complejo estequiometrico” en el cual un enlace peptídico correspondiente al sitio específico para el sustrato primario de la proteasa es roto (Beynon. J y Bond.J, 1994). Estos inhibidores tienen diferentes niveles de expresión en la embriogénesis y se acumula durante el desarrollo de las semillas en el eje embriogénico y cotiledones donde están empaquetados en cuerpos proteicos (Jofuku et al, 1989.,Horisberg y Tacchini-Vonlathen, 1983).



A



B

Fig.1 Gorgojo del camote (*Cylas formicarius*) (A):Ciclo Biológico del gorgojo *Cylas* spp. (B) Raíz reservante afectada por el ataque de *Cylas formicarius*

La familia de genes inhibidores de tripsina tipo Kunitz (SKTI o KTi) comprende hasta 10 miembros mucho de los cuales están fuertemente enlazadas en pares unos tras otro. Tres de los genes inhibidores de tripsina designados como KTi1, KTi2 y KTi3 (donde los dos primeros tienen idéntica secuencia) son expresados en diferentes niveles durante la embriogénesis y probablemente no codifican proteínas con actividad inhibitoria de tripsina. En contraste, la secuencia del gen KTi3 diverge en un 20% de KTi1 y KTi2, y codifica el predominante inhibidor de tripsina tipo kunitz encontrado en las semillas de soja. Es probable que estos tres genes, contienen diferentes combinaciones de elementos de cis-control que programan distintas expresiones cualitativas y cuantitativas durante el ciclo de vida de la soja (Jofuko KD y Goldberg RB, 1989).

III.4 PROTEINASAS DIGESTIVAS EN *Cylas spp*

Rety, 1998 (Quebec, Canadá) mediante métodos cuantitativos estándares, y electroforésis en geles de poliacrilamida con gelatina (gelatin SDS-PAGE) (Michaud et al., 1996) estimó la actividad proteolítica, cuantitativamente y cualitativamente de las proteínas digestivas de tres de las más importantes especies del gorgojo del camote: *Cylas formicarius*, *C. brunneus* y *C. puncticollis* encontrando que estos, usan varios complementos de proteasas digestivas tipo serino, compuestas de diferentes formas proteínicas activas, en un rango de pH alcalino, estas proteasas detectadas fueron inhibidas por serino inhibidores como el PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoruro), el inhibidor de tripsina de caupí (CpTI), y el inhibidor de tripsina de soja tipo kunitz (SKTI) esto, sugirió que la actividad digestiva de estos insectos, dependía de múltiples formas moleculares similares a la tripsina, asegurando así el potencial de los inhibidores vegetales como el SKTI y CpTI, para ser utilizado en el control del gorgojo del camote. Particularmente el SKTI, mostró ser un buen inhibidor, mostrando un mayor espectro de afinidad por estas enzimas, mayor que los inhibidores endógenos de la planta (Cipriani, 1999) aunque, cabe mencionar que los inhibidores de camote como el *spTi-1* ha demostrado tener eficiencia en el control del desarrollo larval de *Spodoptera litura* (F) en plantas transgénicas de Tabaco (Yeh K, W et al, 1997)

III.5 EL PROMOTOR DE LA β -AMILASA DEL CAMOTE

Un promotor, es una secuencia de ADN que dirige la transcripción del gen, que se encuentra bajo su control. Un típico promotor eucarionte, consiste de una secuencia denominada “promotor mínimo” y otras secuencias llamadas “elementos *cis*”. El promotor mínimo, es esencialmente una región de la caja

TATA donde la RNA polimerasa II, la proteína de unión TATA (TBP) y los factores asociados a la TBP, se unen iniciando la transcripción, pero, un promotor mínimo solo, no puede iniciar la transcripción. Los elementos *cis*, los cuales son específicos para cada tejido, donde los factores de transcripción se unen de acuerdo al desarrollo específico, determinan el patrón de expresión espacio-temporal de un promotor y su nivel transcripcional (Mintang et al., 2001). El arreglo que comprende elementos *cis*, seguidos de un promotor mínimo, determina la polaridad y funcionalidad de un promotor. Algunos de los promotores, tienen una actividad constitutiva, es decir, se expresa en toda o en la mayoría de los tejidos de la planta este es el caso del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Philip y Nam-HaiChua., 1990), mientras que otros, son específicos como lo señalamos anteriormente, este es el caso del promotor de la proteína β -amilasa. La expresión constitutiva, de un gen o genes de resistencia recombinantes, pueden causar una fuerte presión de selección en la población de la(s) plagas, permitiendo el aumento de poblaciones resistentes, ya que puede conducir a la selección de todos los estados de vida de las plagas, en toda las partes de la planta en toda la temporada de desarrollo (McGaughey W et al., 1992). Una forma de evitar esto, y prolongar la utilidad del transgen, es el empleo de promotores específicos a ciertos tejidos, estados de desarrollo, específicos a determinados insectos o a determinados electores, que dirijan la actividad del transgen. En cultivos como el camote, el empleo de promotores de genes específicos de la peridermis de la raíz, para dirigir la acumulación de las proteínas recombinantes, puede representar una forma efectiva de proteger a este cultivo. De esta forma, las plagas como el gorgojo del camote, podrían completar su ciclo de vida en el follaje y retrasar la aparición de poblaciones resistentes en el campo (Zhang et al., 2000).

Las proteínas más importantes de la raíz reservante del camote, lo constituyen la esporamina, representa aproximadamente del 60% al 80% del total de proteína soluble y la β -amilasa, el 5% (Nakamura, 1992., Hattori et al, 1989., Yeh et al, 1997). La β -amilasa actúa en la hidrólisis del almidón a maltosa, y la actividad de esta, en las raíces reservantes, depende de las variedades de camote, en algunas de ellas que son ligeramente dulces hay una baja actividad de esta enzima (Martin, 1987; Kumagai et al, 1990., Yoshida et al, 1991). Probablemente, existe solo una copia del gen de la β -amilasa, por genoma haploide en el camote, a diferencia de la esporamina, que es una mixtura de proteínas estrechamente relacionadas (Maeshima et al., 1985) codificada por una familia multigénica (Murakami et al., 1986). La esporamina y la β -amilasa comparten secuencias conservadas en sus respectivos promotores, estas secuencias, juegan un importante rol en coordinar la regulación de su expresión (Nakamura et al., 1992). Se han descubierto que los genes de la esporamina, como de la β -amilasa, es inducible en tejidos como los tallos hojas y peciolo, a altos niveles de sucrosa o otros azúcares metabolizables (Ohto y Nakamura, 1992., Ohto et al, 1995., Takeda et al, 1994). El análisis de los elementos *cis* de los promotores de la β -amilasa, y de la esporamina, nos indica que la secuencia **TGGACGG** juega un

importante rol en la inducción del promotor de β -amilasa por la sucrosa al igual que la secuencia **TACACAGT** (factor SP8a) en el caso de la esporamina (Kenichiro et al, 2001.,Ishiguro et al, 1992).

III.6 INTRODUCCION DE GENES EN PLANTAS

Se han desarrollado diferentes técnicas para poder lograr una eficiente metodología de integración de un ADN foráneo al genoma de la planta proceso conocido como transformación genética de plantas siendo las mas conocidas las siguientes: **A)**Transferencia directa de genes, facilitada por tratamiento con polyethylene glycol electroporación o liposomas en protoplastos. **B)** Microinyección, que es una forma mecánica de transferir genes dentro de protoplastos o incluso a células intactas (Crossway et al, 1986; Reich et al, 1986). **C)** Biobalística, para lo cual se emplea partículas de tungsteno u oro revestidas de ADN que logran introducir ADN al interior de células mediante aceleración. **D)** Empleo de filtros de carburo de silicona, para poder integrar el ADN a la planta. **E)** Empleo de un microrayo de láser, que facilita el ingreso de ADN desnudo. **F)** Agroinfección, en el cual se explota la habilidad natural del microorganismo del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, de transformar plantas (Genevieve, 2000., Block, 1988).

De todas las técnicas mencionadas y hasta hoy desarrolladas las que aparentemente dan los mejores resultados son las siguientes:

- Transformación de protoplastos
- Biobalística o bombardeo con microproyectiles
- Transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.

La transformación de plantas demanda cumplir ciertos requisitos (Hansen y Wright., 2001):

- Contar con tejidos competentes, para propagación y regeneración.
- Contar con un eficiente sistema de integrar el ADN, al genoma de la planta.
- Contar con agentes para seleccionar tejidos transgénicos.
- Contar con la habilidad para recuperar plantas transgénicas, con una frecuencia razonable.
- Contar con un simple, eficiente, reproducible, independiente genotipo y proceso de costo efectivo.

Los diferentes trabajos de transformación de camote, realizados por diferentes autores, demuestran que el sistema de transformación mediada por *A.tumefaciens* es capaz de cumplir los requisitos antes

mencionados (Gamma et al, 1996., Newell et al, 1995., Otani et al, 1997; Prakash et al, 1992., Okada et al, 2001.,Cipriani et al, 1997).

III.6.1 Transformación Genética mediada por *A.tumefaciens*

Los metodos de transformacion utilizan vectores derivados de la bacteria fitopatogena *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria que transfiere a la planta que infecta al ADN situado entre las regiones LB y RB (T-AND) de estos plasmidios . En la naturaleza el *Agrobacterium tumefaciens* infecta a la mayoruia delas plantas dicotiledoneas y algunas monocotiledoneas, produciendoles tumores. La produccion de estas masas desdiferenciasdas de celulas es el resultado de la transferencia e integracion en el el genoma de la planta del pequeño fragmento del T-DNA o DNA de transferencia. La caracterizacion molecular de estos plastidios, el proceso de transferencia y las causas de la sintomatologia que producen , ha sido estudiada con gran detalle por diferentes autores (Draper yScott,1991; Zupan y Zambryski,2000;Hooykas,1989; Puchta,1998;Gelvin,1990)

Basicamente existen dos estrategias para transferir genes de *A.tumefaciens* a plantas, la primera es conocida como la “ estrategia de vectores cointegrados “ utiliza la integracion por recombinacion de los fragmentos deseados clonados previamente en *E. coli* dentro del T-DNA del plasmidio sin las secuencias responsables de la formacion de tumores. La segunda estrategia es llamada “ de vectores binarios “ que aprovecha el echo de que zonas vir pueden ser utilizadas en otro plasmidio (trans), generandose otro que posea al menos las secuencias de los boredes del T-DNA, conjuntamente con los genes que se desean introducir.Existe una gran variedad de plásmidos binarios, algunos de los cuales se encuentran en la Tabla 1, donde se puede observar los refinamientos que se han realizado para incrementar su flexibilidad, para permitir su uso en un amplio rango de especies de plantas. Un origen de replicación de amplio rango, además de un menor tamaño, permite reducir el tamaño del plásmido binario, este es el caso de la familia de vectores *pPZP* que se caracterizan por ser relativamente pequeños, y muy estables, estos vectores utilizan dos orígenes de replicación el Co1E1 y el pVS1 para su replicación en *E.coli* y *A.tumefaciens* respectivamente (HajduKiewicz et al., 1994)

Tabla 1 :Principales vectores binarios publicados

Vector	Tamaño (kb)	Sitio Unico de Restricción en el T-DNA	LacZ	Selección en Bacteria con	<u>Origen de Replicación</u>	
					<i>A.tumefaciens</i>	<i>E.coli</i>
PBIN19	11.7	9	Si	Kanamicina	pRK2	pRK2
PC22	17.5	2	No	Ampicilina Estreptomicina Espectomicina	pRi	Co1E1
PGA482	13.2	7	No	Tetraciclina	pRK2	pRK2
PPCV001	9.2	6	No	Ampicilina	pRK2	Co1E1
PCGN 1547	14.4	5	Si	Gentamicina	pRi	Co1E1
PJJ1881	25.7	4	No	Tetraciclina	pRK2	pRK2
PPZP111	8.9	9	Si	Cloramfenicol	pVS1	Co1E1
Pgreen0029	4.6	18	Si	Kanamicina	pSa	pUC

Fuente: Trends in plant Science (October 2000, vol 5, No 10)

III.6.2 Genes Marcadores y Reporteros

Cuando se realiza transformación genética en plantas, no solo se inserta el gen de interés, que proporciona la actividad deseada a la planta, sino, que este, esta acompañado por lo menos por un gen mas, que puede ser el gen marcador de resistencia que solo permite la subsistencia de los tejidos transformados y/o el gen reportero, que nos permiten discriminar y realizar una rápida búsqueda de tejidos potencialmente transgénicos. Un gen optimo de selección o reportero debe de cumplir los siguientes requisitos (Craazolara et al., 1995):

- a- Su organización genética debe de estar bien descrita.
- b- El producto del gen no debe de estar presente en el organismo o tejido bajo estudio.
- c- El producto puede ser caracterizado con actividad bioquímica observada.
- d- El producto de la reacción catalizada por el debe ser estable y fácilmente cuantificable y detectable.

III.6.2.1 El gen GUS

El gen GUS de la β -glucoronidasa o *Escherichia coli* gusA (uidA) gen (Jefferson 1989), es el mas conocido y usado gen reportero en plantas. La enzima β -Glucoronidasa, es una hidrolasa que cataliza la ruptura de una variedad de β -glucoronidos (Stoeber, 1961 citado por Jefferson 1987), siendo uno de los mas empleados el denominado X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-glucoronido), que como producto de su hidrólisis da un color azul intenso. Esta enzima, esta ampliamente usada, debido a la posibilidad de localizar histoquímicamente, su actividad en mas o menos tejidos de plantas intactas. También es posible cuantificar la actividad GUS, atravez de sensibles ensayos fluorogénicos, aunque esto, involucra la destrucción del tejido blanco y no se puede realizar ensayos “in vivo”. Actualmente, científicos de la compañía CAMBIA han logrado clonar un gen GUS mejorado de la bacteria *Staphylococcus sp*, llamado a este gene “BoGUS”.o “GUSAsta” Se sabe, que este gen tiene propiedades catalíticas y de estabilidad superiores al original gen GUS aislado de *E.coli* (CAMBIA no publicado).

III.6.2.2 La GFP

La GFP o proteína verde de fluorescencia una proteína quimioluminiscente de la medusa *Aequorea victoria* fue descubierto por Shimomura et al 1962 y posteriormente fue clonado y secuenciado a inicios

de los años 90 por Prasher et al 1992 (citados por Tsien., 1998), desde entonces, esta ha sido expresada en diferentes organismos como bacterias, hongos, invertebrados, vertebrados y plantas. Todos los tipos de GFP son monómeros de 27 kDa que consisten de 238 aminoácidos, que se caracterizan por emitir luz verde, cuando son excitados con luz UV a 360-400 nm o luz azul a 440-480 nm. La GFP está compuesta de 11 cadenas β antiparalelas las cuales forman un cilindro muy compacto que tiene un diámetro de 30 Å y una longitud de 40 Å (Yang et al., 1999). Dentro de esta estructura, hay una hélice alfa en el medio del cual se encuentra un cromóforo. La fluorescencia intrínseca, de la proteína es debido a este único cromóforo formado post-transcripcionalmente y autocatalíticamente, por ciclización de los aminoácidos 65,66,67 o Ser-Tyr-Gly. (Haseloff et al, 1995., Tsien, 1998). Hay dos componentes comprendidos en el sistema de bioluminiscencia en la medusa *A. victoria* uno de ellos es la fotoproteína acuarina, que contiene una luciferina uniendo la proteína con el oxígeno, y el segundo, la unión del ion Ca^{2+} a la proteína que permite la oxidación de la luciferina y la consecuente emisión de luz azul, a un complejo que es a menudo llamado proteína fluorescente azul (BFP). In vivo, la energía es transferida desde un estado excitado de la luciferina, a la GFP que es responsable de la fluorescencia verde observada. La GFP, presenta baja toxicidad que no interfiere con la normal actividad celular y es fácil de manipularse. En los últimos años, la GFP está siendo usada extensamente en plantas (Elliot et al, 1999., Harper et al, 1999., Staci et al, 1996) como gen reportero. Aunque, se debe mencionar, que la GFP nativa ha sido modificada varias veces para mejorar su expresión (Stewart., 2001). Las sucesivas modificaciones realizadas, que comprenden la sustitución de secuencias, terminan mejorando la termoestabilidad, aumenta la fluorescencia y altera las propiedades espectrales en GFP, la cual es útil para trabajar en plantas. Aunque, hay todavía una dificultad asociada al empleo de la GFP, y es que es necesario el empleo de equipos especializados y caros, de microscopía de fluorescencia o de emisión de rayos láser, para poder realizar una buena observación de la actividad de la GFP. Esto, es una limitante que no se encuentra, al emplearse el gen reportero GUS. Una posible solución a esto, podría ser usar la fusión de ambas proteínas, esto ha sido probado en *Arabidopsis* y en *Lotus japonicus* (Quaedvlieg et al., 1988., Mantis y Tague., 2000). Estos autores, comentan de la dificultad de detectar actividades débiles de la GFP en tejidos, y ofrecen la posibilidad de utilizar ambos modos de detección con la proteína fusionada. Este principio, impulsó también a la compañía Australiana CAMBIA a diseñar vectores binarios que contienen el gen quimérico que transcribe ambas proteínas fusionadas (CAMBIA web).

III.7 ANTECEDENTES DEL USO DE INHIBIDORES DE PROTEASAS EN CAMOTE

Alguno de los trabajos de mayor relevancia utilizando inhibidores de proteasa en la transformación de camote son los siguientes :

Newell et al 1995, desarrollo la primera línea transgénica expresaba PIs recombinantes en camote, para ello, empleo los vectores binarios pCTI5 conteniendo el gen inhibidor de tripsina del capuli (CpTI), bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor (35S), y el vector binario pPCG6, conteniendo dos genes para resistencia de insectos: el CpTI gen y el gen de la campanilla blanca (*Galanthus nivalis L.*) (GNA) también bajo el control del promotor 35S. En este segundo vector, los genes están orientados frente a frente para evitar delecciones, por eventuales recombinaciones. Estas plantas fueron probadas con gorgojo de la india *Euscepes postfasciatus* en el centro Internacional de la Papa (CIP), encontrándose siete líneas que fueron resistentes o moderadamente resistentes (A.Golmirzale et al 1996 no publicado). Por otro lado, diez líneas que también contienen el gen CpTI fueron utilizadas para ver su utilidad frente al nematodo *M.Incognita*, obteniéndose que tres de las diez líneas evaluadas, una conteniendo solo el gen CpTI, y dos conteniendo los genes CpTI y GNA, presentaron una resistencia consistente, a la necrosis e irritación de la raíz (Zhang D et al 1996. no publicado)

Espinoza C en 1997 en el Centro Internacional de la Papa, construyo el vector binario pCIP5, este, contiene el gen inhibidor de quimi tripsina del frijol alado (*WCI-3*) bajo el control del promotor de la β -amilasa, constiyuendose así, el primer esfuerzo para utilizar un promotor no constitutivo dirigiendo la transcripción de un inhibidor de proteinasas en camote. Actualmente, las plantas transformadas con este vector, se encuentran en proceso de selección y evaluación (Cipriani 2001 no publicado)

Cipriani et al., 1999 desarrollo líneas trasgénicas de camote que expresan el gen inhibidor de proteinasa de soja *skti-4*, un gen, que es análogo al gen KTi3 (un miembro de la familia de los genes SKTI), utilizando para ello el vector binario pKTI-4, desarrollado por la compañía Axis Genetics, U.K, que contiene este gen bajo la dirección del promotor 35S, además, del gen reportero β -glucoronidasa (GUS). encontró dos clones presentan una interesante actividad inhibitoria, como para ser incorporados en programas de control del gorgojo del camote

Cipriani et al 2001, desarrollo líneas transgénicas de camote para resistencia del virus del moteado plumoso (SPFMV), un miembro del genero de los potyvirus, utilizando para ello el vector binario pBI_{inh}-OCI, proporcionado por Michaud D. que contiene el un gen cysteina-inhibidor de arroz (oryzacystatin I) que actúa inhibiendo la proteólisis de una polyproteína de replicación del potyvirus. De las 25 líneas transgénicas obtenidas, 18 de ellas mejoraron su resistencia a SPFMV.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente tesis, fue realizada en las instalaciones de los laboratorios de Transformación Vegetal, Modificación Geonómica y electroforésis de Centro Internacional de la Papa (CIP)

IV.2 MATERIALES

IV.2.1 Material Vegetal

Se emplearon plántulas in vitro de camote (Fig. 4), libre de patógenos, de la variedad Tanzania. Las plantas, fueron suministrados por el laboratorio de transformación vegetal del CIP, estas, son propagadas continuamente en medio MPB (ver Anexo IX) en magentas GA-7 (SIGMA V8505), y son mantenidas, en condiciones de fotoperíodo de 16 horas de luz a 3000 lux, a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y una humedad de 70%. Estas plantas, pertenecen al Banco de Germoplasma del CIP.



Fig. 2 Planta de camote del cultivar Tanzania propagada in vitro

IV.2.2 Material Genético

Cepas Bacterianas

- a) Cepa DH5 α de *Escherichia coli*, perteneciente al genotipo supE44 Δ lacU169(ϕ 80,lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1 (Sambrook et al., 1989).
- b) Cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta cepa, corresponde al *A.tumefaciens* Ach5, y porta el plásmido Ti “desarmado” pAL4404 (Wordragen y Dons, 1992)

Plásmidos

- a) pUC18 (Colección CIP)

Este plásmido de 2686 pares de bases (pb), contiene un polilinker o sitio de multiclonamiento, con varios sitios de restricción únicos, útiles, para clonar fragmentos ADN, dentro de la secuencia del gen *lacZa*, que nos permite realizar una búsqueda rápida de colonias recombinantes. Además, cuenta con un gen que codifica la β -lactamasa, que le confiere resistencia a la ampicilina.

- b) pPCR-Script Amp SK(+) (Colección CIP)

Este plásmido de 2961pb, es un derivado del pBluescript II SK (+) phagemid. Este, contiene un gen de resistencia a la ampicilina, un promotor *lac* para expresión de genes, los promotores T3 y T7, para la producción “in vitro” de RNA, un polilinker, con sitios únicos de restricción dentro de la secuencia del gen *lacZa*, flanqueado por secuencias para iniciadores M13, convenientes para experimentos de secuenciamiento de ADN.

- c) pCIP4 (Colección CIP (Figura. 3))

Este plásmido de 5773pb, es una modificación del plásmido pCIP2, que a su vez es un derivado del pBA5 (Kenechiro et al., 2001), este, contiene el promotor de la β -amilasa de camote de 1300pb, un gen inhibidor de quimi tripsina del fríjol alado (*wci-3*), además, del gen de resistencia a la ampicilina (Espinoza et al., 1997).

- d) pKTI-2 (Proporcionado por la compañía Axis Genetics, U.K.) (Figura. 4))

Este es un derivado, del plásmido pUC19, y contiene un inserto entre los sitios *HindIII/BamHI* denominado 35S-skti-4-3'nos de 1400 pb, donde, 35S es el promotor del virus del mosaico de la coliflor, 3' nos, es el terminador de la nopalina sintetasa y *skti-4* (gen inhibidor de tripsina (no publicado)) (Newell citado por Cipriani., 1999). Una alineación entre el gen *skti-4* y el gen *KTi3* realizado mediante el programa Alig X (www.informaxim.com), nos mostró que este es un gen análogo al gen *KTi3* (tiene un 99.5% de similaridad) descrito por Jofuko y Goldberg., 1989 (Anexo I), por lo tanto un miembro mas de la familia de genes KTi o SKTI (gen inhibidor de tripsina de soja tipo Kunitz)

e) pMOG800 (Colección CIP(Figura. 5))

Este plásmido o vector binario, de 11336pb tienen dentro del T-DNA, un *nptII* que codifica a la enzima neomicina fosfotransferasa natural (NPTII), que confiere resistencia al antibiótico Kanamicina, este, esta controlado por el promotor 35S. Además, el vector tiene un polilinker, con sitios únicos de restricción. Este vector, ha demostrado su eficiencia en experimentos de transformación vegetal (fuente CIP).

f) pCAMBIA-1304 (Proporcionado por CAMBIA. (Figura. 6))

Este vector binario, de 12361pb, es una modificación de un pequeño pero versátil vector construido por Hajdukiewicz et al., 1994 para transformar plantas, denominado *pPZP*. Contiene dentro del T-DNA, el gen de la higromicina fosfotransferaza *hptII* de resistencia al antibiótico Higromicina, un polilinker, dentro de la secuencia del gen *lacZ* perteneciente al polilinker del pUC18, además tiene una fusión de los genes mGFP5 y GUSa, el primero, es una versión mejorada del gen de la proteína verde de fluorescencia (GFP), y el segundo (no publicado), fue aislado de *Staphylococcus sp*, y tiene propiedades superiores al gen GUSA de *E.coli*, comúnmente empleado (Jefferson et al.,1987). Este vector, cuenta además, con sitios de restricción convenientes, dentro de la secuencia del gen *lacZa*, que nos facilita, la búsqueda de colonias recombinantes (CAMBIA website: <http://www.cambia.org>).

Estos plásmidos, se encuentran dentro de la Cepa *DH5α* de *Escherichia coli*, y pertenecen a la colección de Bacterias del CIP. Se encuentran criopreservadas a -70°C .

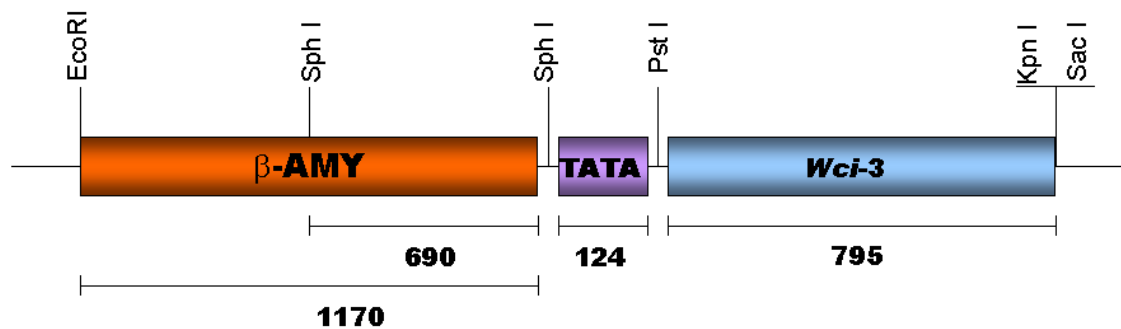


Figura 3. Plásmido pCIP4(5773 pb). Se puede observar los siguientes elementos: el promotor de la β -amilasa de camote (β -Amy mas caja TATA) y el gen inhibidor de quimi tripsina (*wci-3*). El tamaño de cada uno de estos elementos además de la distancia entre algunos sitios de restricción, en pares de bases, esta indicado por los números ubicados debajo de cada uno de ellos.

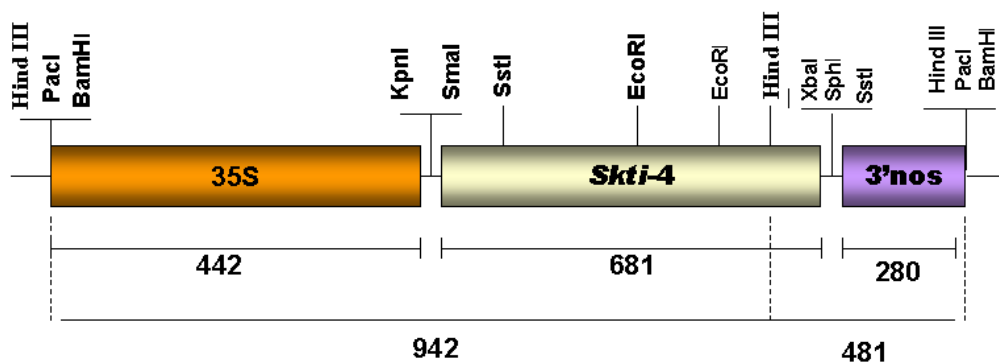
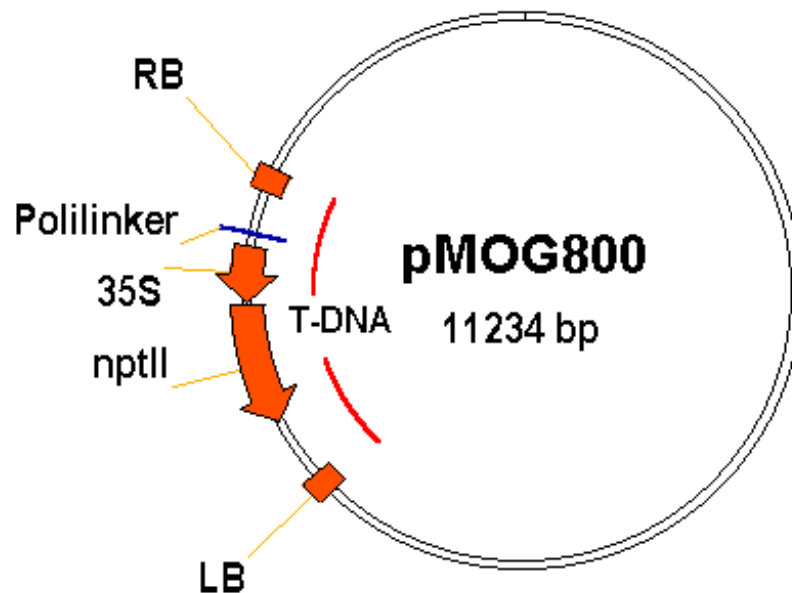


Figura 4. Plásmido pKTI2 (4219 pb). Se puede observar los siguientes elementos: el promotor 35S además del gen *skti-4* y el terminador 3'nos, o terminador de la nopalina sintetiza. El tamaño de cada uno de estos elementos, además de la distancia entre algunos sitios de restricción, en pares de bases, esta indicado por los números ubicados debajo de cada uno de ellos.



Secuencia del Polilinker :

EcoRI KpnI SmaI BamHI XbaI XhoI HindIII

GAATTCTGGTACCTCCCGGGAGGATCCATCTAGAGCTCGAGTAAGCTT

SacI

Fig. 5 Plásmido Binario pMOG-800 (11234 pb). En el T-DNA se pueden observar los siguientes elementos: RB= borde derecho, LB= Borde izquierdo, el gen *nptII* de resistencia a Kanamicina. El promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y el polilinker con sus sitios de restricción más importantes se puede observar en la parte inferior.

IV.3 MÉTODOS

El procedimiento general seguido en la presente tesis se puede observar en la figura 7. Los detalles específicos se detallan a continuación:

IV.3.1 VERIFICACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS PLÁSMIDOS EMPLEADOS:

A bacterias conteniendo los plásmidos pCIP-4 y pKTI-2 se les realizaron mini preparaciones plasmidiales mediante lisis Alcalina (Anexo III) y los plásmidos obtenidos fueron sometidos a diferentes cortes con enzimas de restricción (por pares) de la manera siguiente: pCIP-4 con *SphI/PstI*, *EcoRI/SacI* y *EcoRI/PstI* y pKTI-2 con *SmaI/BamHI*, *BamHI/PstI* y *HindIII*. Todas las enzimas fueron empleadas bajo condiciones del fabricante (PROMEGA). Las reacciones de fueron incubadas por dos horas a 37°C y sometidas a su análisis por electroforesis, en gel de agarosa al 1% teñido en Bromuro de etidio.

Para poder verificar el tamaño de la caja TATA del promotor de la β -amilasa, se secuencio este, utilizando el plásmido pPCR-Script, conteniendo este promotor entre los sitios *EcoRI* y *PstI*, utilizado en la construcción del plásmido pCIP36 (ver mas adelante). El método usado, fue el de *terminación de cadena* desarrollado por Sanger, combinando con la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), utilizando para ello, el kit *fmol[®] DNA Cycle* (PROMEGA) con un iniciador “reverse” M13 marcado radiactivamente, con fósforo 32 (³²P). La reacción de ligación, se corrió en un gel de acrilamida de acuerdo ala metodología desarrollada por Sambrook et al. , 1989 (Anexo VI), posteriormente, las secuencias, fueron leídas para verificar si corresponde a las secuencias esperadas.

Iniciador empleado: pUC/M13 reverse (17mer): 5’d(CAGGAAACAGCTATGAC)-3’.El Iniciador “reverse” amplificara desde el extremo 3’ donde se ubica la caja TATA (Fig. 10)

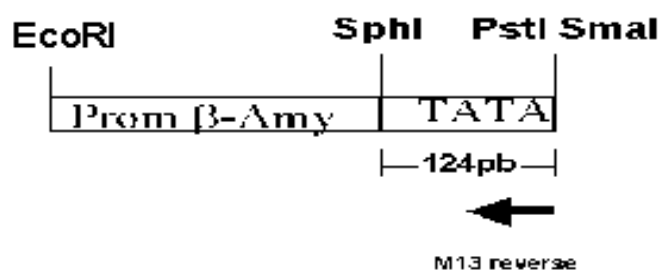


Fig. 7 Anclaje del iniciador “reverse” M13 en el promotor de la β -amilasa

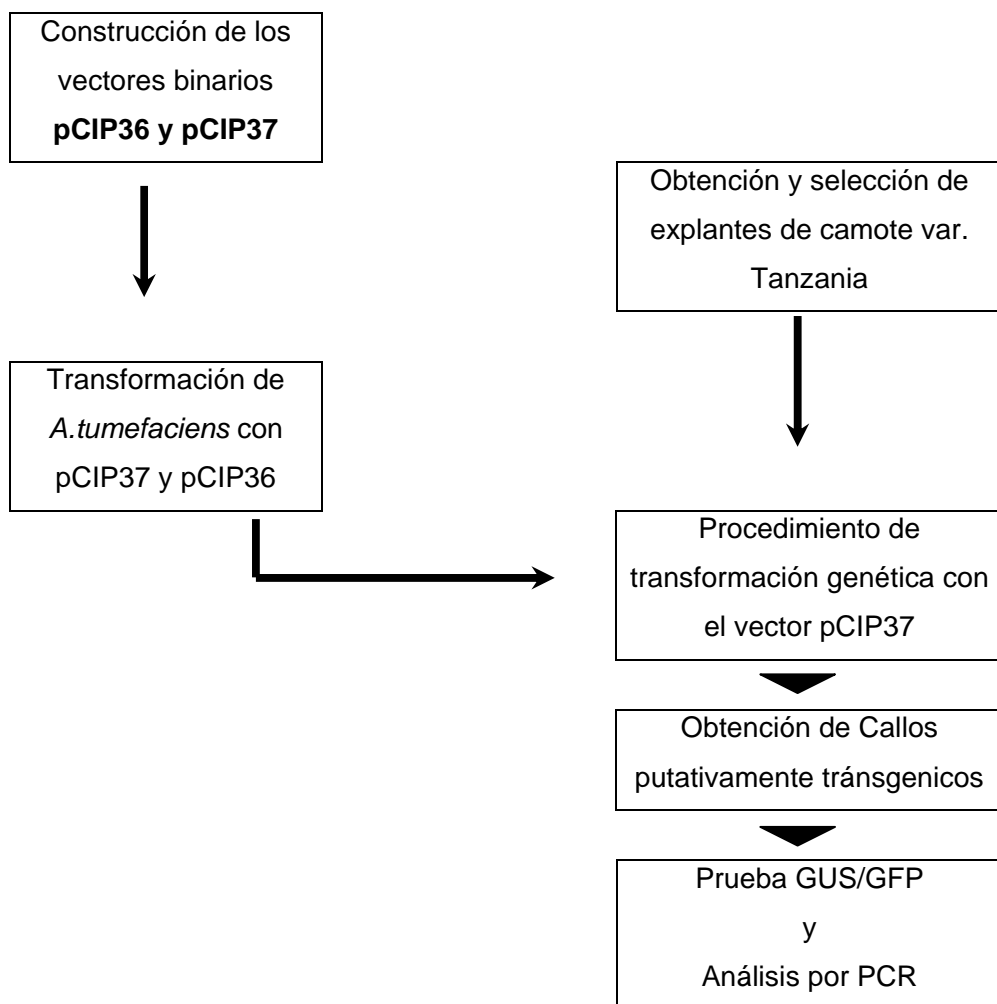


Fig. 9 Esquema que resume de modo general todos los procedimientos desarrollados en la presente tesis.

IV.3.2 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR PCIP36

La metodología en la construcción del vector pCIP36 esta resumida en la Fig.9. Los detalles específicos comprendieron los siguientes pasos:

IV.3.2.1 Obtención del gen *skti-4* y el promotor de la β -amilasa

Aproximadamente 0.5 μ g del plásmidos pKTI2 y pCIP-4(secIII.2.2), fueron digeridos simultaneamente con 20 unidades de las enzimas *SmaI/BamHI* y *EcoRI/PstI* respectivamente, enseguida, el volumen total de la reacción de digestión fue sometido a una corrida electroforética en gel de agarosa (0.8%). Luego, el fragmento correspondiente al gen *skti-4* y al promotor de la β -amilasa, fueron detectados, con la ayuda de un transiluminador UV y extraído del gel con la ayuda de una hoja de bisturí estéril, y colocados a un tubo de microcentrífuga, con sistema de filtración (SPIN-X, COSTAR, Cat 1-800-492-1110) y puestos a -70°C por 2 horas, seguidamente, se centrifugo a 14000 r.p.m. por media hora. La solución filtrada, que contiene el ADN, fue precipitada con 1/10 de volumen de Acetato de Sodio 3M pH 4.8 y dos volúmenes de etanol absoluto. El pellet obtenido, fue resuspendido en etanol al 70%, centrifugada por 5 minutos, secados, y resuspendidas en 12 μ l de agua SIGMA. Las muestras, fueron analizadas y cuantificadas por electrofóresis en gel de agarosa al 1% teñido en bromuro de etidio y luego almacenadas a -20°C .

IV.3.2.2 Extracción del plásmido binario pMOG800 purificado

Para la obtención de plásmidos pMOG800, de alta calidad y pureza, se uso el kit de purificación "Minipreps "ADN Wizard Plus SV siguiendo el protocolo recomendado por los fabricantes (PROMEGA), (Anexo III).

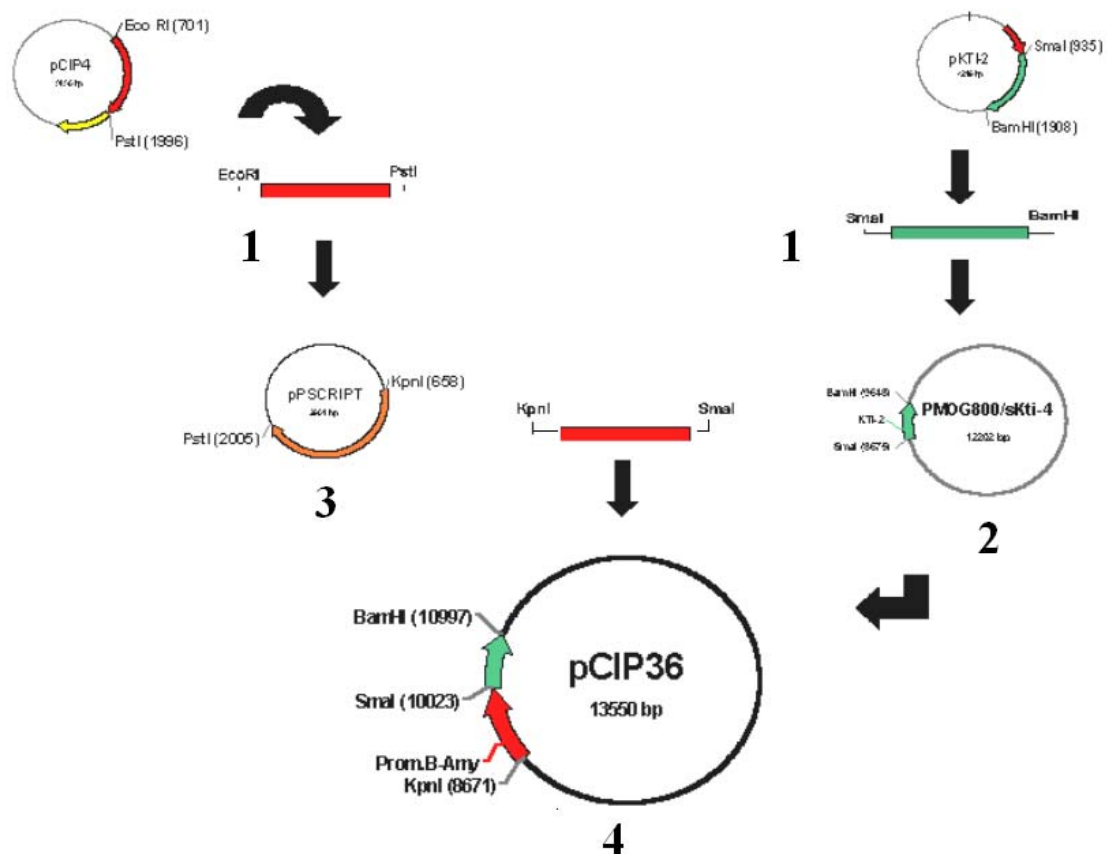


Fig. 9 Metodología utilizada para la construcción del plásmido pCIP36:

1. Obtención del gen *skti-4* y del promotor de la β -amilasa del plásmido pKTI-2 y pCIP4 respectivamente.
2. Subclonación del gen *skti-4* en plásmido binario pMOG800.
3. Subclonación del promotor de la β -amilasa en el plásmido pPCR-Script.
4. Subclonación del promotor de la β -amilasa en plásmido binario pMOG800 que contiene el gen *skti-4* y formación del vector binario **pCIP36**.

IV.3.2.3 Subclonaje del gen *skti-4* en el plásmido pMOG800

El gen *skti-4* obtenido anteriormente fue ligado en el plásmido pMOG800 digerido previamente con las enzimas *SmaI/BamHI* utilizando 100ng de vector y 24ng de inserto, 10 unidades de T4 DNA ligasa en condiciones de fabricante (PROMEGA) completando la reacción a un volumen final de 10µl la reacción se incubó a 14°C por 16 horas. Enseguida se procedió a la transformación de bacterias *E.coli DH5α* por electro transformación usando un electroporador BIO-RAD modelo *E.coli* Pulser en las siguientes condiciones: 200Ω de resistencia, 2.5kV de caída de potencial y 25 µF de conductancia, usando cubetas especiales de la misma marca mantenidas a 4°C con la mezcla de 2µl de ligación y 40µl de bacteria electro-competente preparadas con antelación y mantenidas a –80°C (AnexoIVA). Luego de ser sometidas a la carga eléctrica son vueltas a 4°C aproximadamente 1 minuto y posteriormente estabilizadas en 1ml de medio de crecimiento SOC (Anexo IV) a 37°C con agitación fuerte de 225rpm durante 1 hora en tubos de 25ml. Pasado ese tiempo se sembraron entre 50-250 µl de este medio en placas con LB agar más antibiótico Kanamicina (100mg/l), para la selección de los clones positivos por medio de antibiótico. Las placas se incuban a 37°C entre 12 y 18 horas. A las colonias obtenidas se les realizó mini preparación plasmidial por lisis alcalina (AnexoIII) a los plásmidos obtenidos se les realizó un doble corte con 10 unidades de las enzimas de restricción *SmaI* y *BamHI* bajo condiciones del fabricante (PROMEGA) se incubó durante 2 horas a 37°C, se corrió en un gel de agarosa al 1% y se ubicó colonias positivas.

IV.3.2.4 Subclonaje del promotor de la β-amilasa, en el plásmido pPCR-Script

Se procedió a realizar la reacción de ligación entre el promotor de la β-amilasa obtenido anteriormente (Sec III.3.2.1) y el plasmido pPCR-Script (sec III.2.2) usándose 100ng del vector, 24ng de inserto, 10 unidades de T4 DNA ligasa en condiciones de fabricante (PROMEGA) completando la reacción a un volumen final de 10µl y se incubó a 14°C por 16 horas. Con esta reacción de ligación fueron transformadas *E.coli DH5α* por electroporación con un procedimiento igual a señalado en la Sec III.3.2.3 con la diferencia que el medio de selección contiene Ampicilina (100mg/l) IPTG y XGal. A las colonias blancas se les realizó mini preparación plasmidial por lisis alcalina (Anexo III) y a los plasmidos obtenidos un doble corte con 10 unidades de las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* bajo condiciones de fabricante (PROMEGA) se incubó durante 2 horas a 37°C se corrió en un gel de agarosa al 1% ubicándose colonias positivas.

IV.3.2.5 Clonamiento del Promotor de la β -amilasa en el vector pMOG800/*skti-4*

Con el fin de clonar el promotor de la β -amilasa en el plásmido pMOG800, se procedió nuevamente a obtener el promotor de la β -amilasa utilizando el mismo procedimiento anterior (SecIII.3.2.1) con la diferencia que se utilizan las enzimas *KpnI* y *SmaI*. Posteriormente se ligo este al vector pMOG800 que ya contiene el gen *skti-4* usándose 100 ng de vector, 6 unidades de T4DNA ligasa bajo las condiciones del fabricante (PROMEGA) a un volumen final de 10 μ l por 16 horas a 14°C. Con esta mezcla de ligación fueron transformadas *E.coli DH5 α* por electroporación con un procedimiento igual al señalado en III.3.2.3. Los clones crecidos fueron probados por un análisis de electroforesis en gel de agarosa al 1% a este vector conteniendo el promotor de la β -amilasa unido al gen *skti-4* (caset β Amy/*skti-4*) se le denominó **pCIP36**

IV.3.3 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR PCIP37

La metodología en la construcción del vector pCIP37 esta resumida en la Fig.10. Los detalles específicos comprendieron los siguientes pasos:

IV.3.3.1 Obtención del promotor de la β -amilasa mediante PCR

El promotor de la β -amilasa, fue amplificado mediante PCR a partir del plásmido pCIP4. Los iniciadores empleados, que tienen incorporados sitios *Sall* y *SmaI* a sus extremos (Fig.11), fueron diseñados sobre la base de la secuencia del promotor, utilizando para ello el programa Vector NTI7 (www.informax.com).

Iniciadores empleados:

betaamy (forward) 5'-GGGTCGACCCGTACAAAGTATTAAACGTGC-3'
Sall

betaamy (reverse) 5'-GCCCCGGGCTGCAGAATAATGGAGA-3'
SmaI

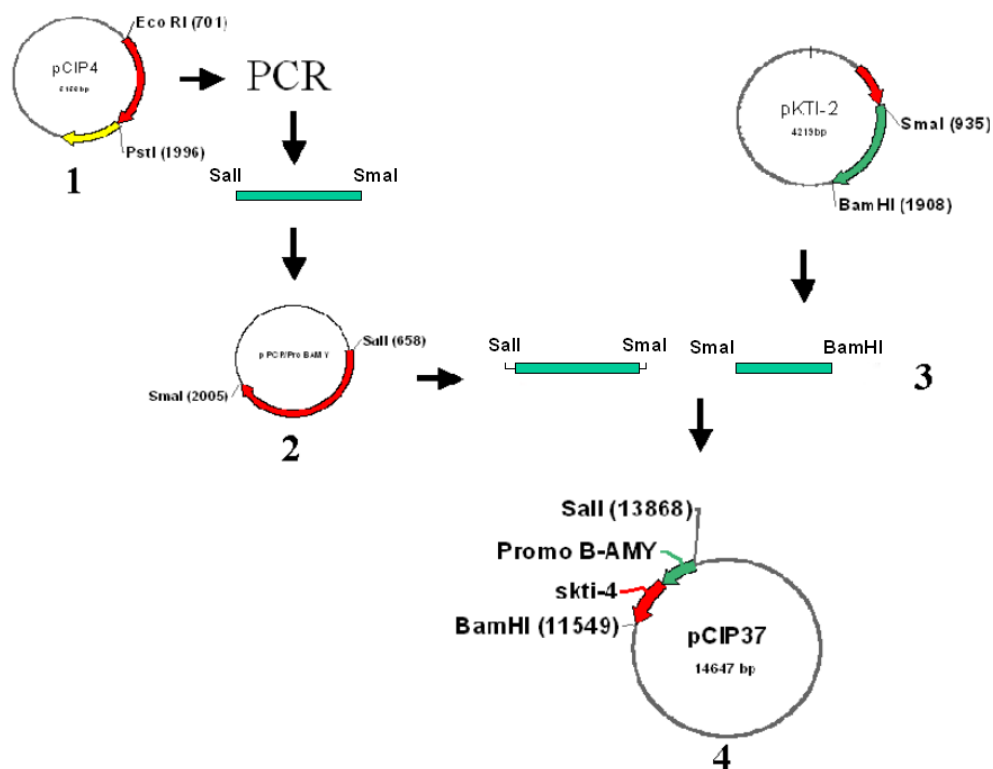


Fig. 10 Metodología utilizada para la construcción del plásmido pCIP37.

1. Obtención del promotor de la β -amilasa del plásmido por PCR.
2. Subclonación del promotor de la β -amilasa en el plásmido pPCR-Script.
3. Obtención del promotor del gen *skt-4*.
4. Ligación simultanea del promotor de la β -amilasa y el gen *skt-4* en el vector binario p-CAMBIA1304.

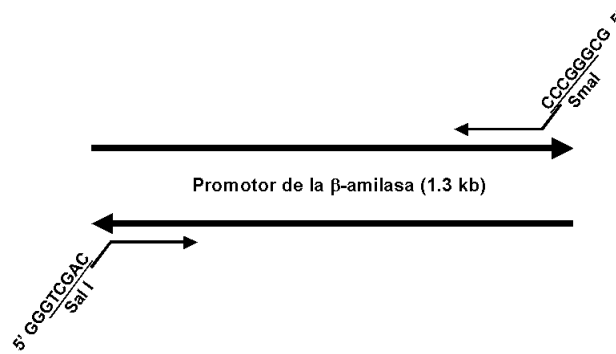


Fig.11. Anclaje de los iniciadores a los extremos del promotor de la β -amilasa. Se puede observar los sitios de restricción *SalI* y *SmaI* a los extremos de los iniciadores. En la parte inferior se observa con mayor detalle la secuencia de los iniciadores.

Previamente a la amplificación del promotor, fue necesario obtener la temperatura de apareamiento apropiado de los iniciadores, utilizando para ello, muestras del plásmido pCIP4, en un termociclador en gradiente que nos permitió evaluar 14 temperaturas simultáneamente (Anexo II). Una vez obtenido la temperatura optima apropiada (66.2°C) se procedió a amplificar utilizando para ello, el siguiente Mix:

Reactivo	Concentración stock	Volumen(μ l)	[] final
H2O	-	7.88	-
Buffer 10X	-	1.5	1x
DNTPs	5mM	1.2	0.4mM
MgCl2	50mM	0.72	2.4mM
Forward	10 μ M	0.3	0.2 μ M
Reverse	10 μ M	0.3	0.2 μ M
Taq	5U/ μ l	0.1	0.03U/ μ l
Muestra	5ng/ μ l	3.0	1ng/ μ l
Vol.Final	-	15.00	-

El programa de amplificación usado, para los iniciadores de la β -amilasa fue el siguiente:

1 ciclo 1' a 94°C
35 ciclos 1' a 94°C
 2' a 66°C
 3' a 72°C
1 ciclo 7' a 72°C

IV.3.3.2 Subclonación del promotor de la β -amilasa en el plásmido pPCR-Script

Posteriormente la reacción de amplificación quedó lista para su análisis por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% teñido en bromuro de etidio en el que se apreció el amplificado. El amplificado fue rescatado del gel de agarosa con un procedimiento igual al señalado en III.3.2.1 y luego fue sometido a una doble digestión con las enzimas *Sall* y *SmaI* bajo condiciones de fabricante y luego se ligo al vector pPCR-Script también digerido con estas mismas enzimas usándose 54 ng de vector, 6 unidades de T4 DNA ligasa, bajo condiciones de fabricante (PROMEGA), completando la reacción con el producto de PCR a un volumen final de 10 μ l. La reacción se incubó a 14°C por 16 horas. Con esta reacción de ligación fueron transformadas *E.coli* DH5 α a por electroporación con un procedimiento igual a señalado en IV.3.2.3. A las colonias blancas se les realizó mini preparación plasmidial por lisis alcalina y a los plásmidos obtenidos se les realizó un doble corte con 10 unidades de las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* bajo condiciones de fabricante (PROMEGA) se incubó durante 2 horas a 37°C se corrió en un gel de agarosa al 1% ubicándose colonias positivas.

IV.3.3.2 Ligación simultánea, del promotor de la β -amilasa, y el gen *skti-4*, en el vector pCAMBIA1304

Se obtuvo nuevamente el promotor de la β -amilasa del plásmido pPCR-Script con extremos 5'- *Sall* y 3'- *SmaI* a continuación este, fue ligado en forma simultánea con el gen *skti-4* con extremos 5'-*SmaI* y 3'-*BamHI* obtenidos anteriormente, en el vector pCAMBIA1304 purificado, y digerido previamente con 20 U de las enzimas *Sall* y *BamHI*. La ligación, fue realizado de la misma forma que en los casos anteriores con 100ng de vector y 24ng de cada inserto a un volumen final de 10 μ l por 16 horas a 14°C. Con esta mezcla de ligación fueron transformadas *E.coli* DH5 α por electroporación con procedimiento igual al lo señalado en IV.3.2.3 con la diferencia de que el medio de selección contiene IPTG X-Gal. El único clon crecido fue

recuperado por mini preparación plasmidial (AnexoIII) y el plásmido sometido a su análisis por electrofóresis en gel de Agarosa. A este vector conteniendo el promotor de la β -amilasa unido al gen *skti-4* (caset β Amy/*skti-4*) se le denominó **pCIP37**

IV.3.4 CONSTRUCCIÓN DEL PLASMIDO PCIP38

Con el fin de tener el caset β -Amy/*skti-4* en un pequeño vector se realizó exactamente, el mismo procedimiento utilizado en la construcción del plásmido pCIP36, pero, utilizando el plásmido pUC19, en lugar del plásmido pMOG800, a este se le denominó **pCIP38**.

IV.3.5 ANÁLISIS DE LOS VECTORES OBTENIDOS.

IV.3.5.1 Análisis de restricción

Los plásmidos obtenidos, pCIP36, pCIP37 y pCIP38 fueron evaluados, mediante un análisis de restricción, con diferentes enzimas de restricción, de la siguiente forma: todos los plásmidos fueron digeridos con las enzimas *EcoRI/PstI*, *SmaI/BamHI* y luego en forma individual de la siguiente forma: pCIP36 con *XhoI*, pCIP37 con *Sall/KpnI* y pCIP38 con *Sall*. Luego las restricciones, fueron analizadas en un gel de agarosa al 1%.

IV.3.5.2 Expresión de los genes reporteros mgfp5 y GUSa en *E.coli*

Para observar la actividad del gen de la GFP, se tomó una alícuota de un caldo bacteriano conteniendo el vector pCIP37 y se puso bajo un microscopio de fluorescencia OLYMPUS BH con un filtro IF490 para que las bacterias sean expuestas a longitudes de ondas de entre 390.-480nm, excitando así a la GFP a emitir fluorescencia a 508 nm (verde fluorescente). Para observar la actividad GUSa, se procedió a agregar a 200 μ l del caldo de *E.coli* anterior 20 μ l del sustrato X-Gluc incubándose media hora a 37°C para luego observar la actividad de la enzima β -glucoronidasa.

IV.3.6. TRANSFORMACIÓN DE *Agrobacterium tumefaciens* CON LOS PLÁSMIDOS BINARIOS pCIP36 Y pCIP37.

La cepa *A.tumefaciens* LBA 4404 fue transformada con los vectores binario pCIP36 y pCIP37 por electroporación de células competentes previamente preparadas (Anexo IVB) usando un electroporador BIO-RAD en las mismas condiciones y con un protocolo similar al descrito para *E.Coli* (IV.3.2.3) con la diferencia que la temperatura óptima de recuperación y crecimiento, para esta bacteria es de 28°C y el periodo de recuperación postelectroporación es de 3 horas. A su mismo las bacterias fueron sembradas

en placas con medio YM-Agar (Anexo III) suplementado con Kanamicina (100mg/l) y Estreptomicina (100mg/l) e incubada por 28°C por 48 horas. Cada una de las líneas celulares conseguidas fueron recuperadas por mini preparaciones plasmidiales mediante lisis alcalina (AnexoIII) y se reconfirmaron con análisis de restricción con las enzimas *XhoI* para pCIP36 y *Sall/KpnI* para pCIP37. Los resultados fueron analizados en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio a partir del cual fue posible concluir la presencia del caset β -Amy/*skti4*.

IV.3.7.1 Prueba de Southern Blot de *A.tumefaciens* recombinantes

Con la finalidad de descartar algún proceso de precombinación ilegítima en la transformación de *A.tumefaciens* con el vector binario pCIP37 se realizó la prueba de Southern Blot, para ello, se utilizó la metodología descrita por Southern en 1975 (citado por Sambrook *et al*, 1989) (Fig.12) que a continuación se detalla:

IV.3.7.1.1 Electroforésis y transferencia de ADN

Para la transferencia se utilizó el mismo gel de agarosa anterior en el cual se corrió la restricción de los plásmidos pCIP37 obtenido de *A.tumefaciens* (sec. IV.3.7) donde se puede observar el caset β Amy/*skti-4* además de otra banda inesperada debajo de este. El gel, fue tratado con una solución de depuración, durante 10 minutos, e inmediatamente, fue pasado a la solución de denaturación, dos veces por 15 minutos, y finalmente a una solución de neutralización, dos veces, por 30 minutos (Anexo V). Posteriormente, el ADN del gel fue transferido a una membrana de nylon (Amershan N+) por capilaridad como se muestra en la Fig. 13

IV.3.7.1.2 Marcaje no radioactivo de la sonda e hibridación de la membrana

Se utilizaron 85 ng de ADN, correspondiente, al caset β Amy/*skti-4* (obtenidos del vector pCIP38 digerido con la enzima *Sall* mediante idéntico procedimiento seguido III.3.2.1) y al marcador de ADN de fago lamda, digerido con la enzima *PstI* fueron utilizados como sondas. Para ello fue necesario marcarlos con la enzima fosfatasa alcalina, utilizando el kit **Alkphos Direct Labelling** an Decton System El procedimiento, fue seguido según las recomendaciones de los fabricantes(Amershan RPN 3690).

El ADN de simple hebra (denaturado), se mezcló con el buffer de marcaje, y la enzima fosfatasa alcalina, luego, se agregó el formaldehído para formar el enlace covalente entre la enzima y el ADN

(Fig.14A y B). En forma paralela al marcaje, se procedió con el proceso de prehibridación de la membrana, durante 30 minutos, con 16 ml de buffer de hibridación (0.25 ml de buffer de hibridación por cm^2 de membrana), precalentado calentado a 55°C .. Inmediatamente después, se procedió al proceso de hibridación con las sondas marcadas (5ng de sonda por ml de buffer de hibridación), este proceso, duro toda la noche. Al día siguiente, la membrana fue lavada dos veces a 55°C con el buffer de lavado primario, durante 10 minutos. Inmediatamente, la membrana fue pasada al buffer de lavado secundario, durante 5 minutos a temperatura ambiente (Anexo V).

El proceso de detección (Fig.14C), fue realizado agregando directamente sobre la membrana, el reactivo de detección ($40\mu\text{l} / \text{cm}^2$), y fue difundido cuidadosamente luego, se escurrió el exceso del reactivo, y la membrana envuelto en Saran wrap TM. Inmediatamente después, y bajo luz roja, se puso en contacto con la película Hyperfilm-ECL (Amershan RPN 3103K) por 30 minutos y. se procedió a revelar el film.

IV.3.8 TRANSFORMACIÓN DE CAMOTE (*Ipomoea batatas*. Lam).

El proceso de transformación genética de camote se llevó a cabo mediante embriogénesis somática, de acuerdo al procedimiento descrito por Cipriani, 1999 y Medina, 1991

IV.3.8.1 Obtención de Explantes

Para el proceso, se empleo plantas “in vitro” de la variedad Tanzania, proporcionados por el laboratorio de ingeniería genética del CIP. Se empleo hojas completas de posición apical preferentemente (incluyendo de 0.5-1 cm de pecíolo) de aspecto saludable y vigoroso debido al potencial organogénico de estas (Medina, 1991).

IV.3.8 2 Preparación de las bacterias

Las bacterias de *A.tumefaciens* LBA 4404, criopreservadas a -70°C , transportando el plásmido binario pCIP37, fueron replicadas en placas petri conteniendo medio YM sólido, suplido con 100 mg/ml de Kanamicina y 100 mg/l de Estreptomicina. Las placas, fueron incubadas a 28°C por 48 horas. A continuación, se sembraron seis alzas de micrón bien llenas de cepas de *A.tumefaciens* en 3 tubos Falcon de 50 ml, que contenía 30 ml de medio YM suplementado con 100 mg/l de Kanamicina y 100 mg/l de Estreptomicina. Un tubo, con el mismo medio fue usado como testigo (sin bacterias). Los tubos, crecieron a 28°C y 250 r.p.m de agitación durante dos días (48 horas). Al tercer día, se determino la concentración de bacterias, con la ayuda de un espectrofotómetro Spectronic (Milton Roy, Rochester, NY, USA), para esto, se tomo 1ml de cultivo de bacterias, que fue colocado en una cubeta para lectura de 1cm de capacidad. Cuando la lectura de la densidad óptica a 620nm (OD^{620}), alcanzo 0.5, se procedió a centrifugar los tubos a 3000 r.p.m por 20 minutos, se desecho el sobrenadante, y se resuspendio en el medio para bacterias (Anexo VII) para alcanzar una dilución de 5×10^7 células/ml, determinada como la mas óptima, para transformar camote (Cipriani., 1999).

IV.3.8 3 Inoculación

Para proceder a inocular, se procedió a poner los explantes, en una placa petri estéril y se procedió a cortar la parte superior del limbo. Los explantes así, fueron trasladado inmediatamente a placas petri, conteniendo el medio para explantes (Anexo VII) donde fueron almacenados. Terminada la colección

de todos los explantes, se procedió a distribuir la solución con las bacterias, en placas petri esteriles donde se trasladaron los explantes donde permanecieron infectandose durante 1h.

IV.3.8 4 Cocultivo

Los explantes infectados, fueron trasladados a un papel filtro tipo Whatman N°2 estéril, para retirar el exceso de humedad producido por el caldo bacteriano. Posteriormente, estos fueron trasladados al medio sólido de cocultivo (Anexo VII), suplido con 100 µl de acetosiringona (200 µM), donde, se colocaron 5 explantes por placa petri durante 48 horas.

IV.3.8 5 Obtención de Callos

Inmediatamente después, del proceso de cocultivo, los explantes fueron pasados por diferentes medios de regeneración, que nos permitieron la obtención de callos embriogénicos. Así, todos los explantes fueron pasados al primer medio de regeneración, denominado F15. Los explantes, permanecieron aquí, durante 48 horas, posteriormente los explantes, fueron pasados al segundo medio de regeneración denominado F9 aquí, los explantes permanecieron durante 1 mes y medio, donde, fueron evaluados cada 15 días, observándose, la aparición o no de callos. Luego de este tiempo, se procedió a separar los callos (de limbos y de peciolos), de los restos de tejido necrosado y muerto. Los explantes, posteriormente, fueron trasladados al tercer medio denominado G24D (Anexo VII). Aquí, los callos, fueron separados por su origen y etiquetados, permaneciendo, (cambiando al mismo medio cada 15 días) durante 4 meses, hasta la evaluación final, donde se observó, con la ayuda de un estereoscopio la aparición de embriones somáticos.

Los callos, obtenidos fueron contados, evaluados y agrupados, de acuerdo a su origen y aspecto, también, se evaluó la expresión de los genes reporteros GFP/GUS en forma separada de la siguiente forma:

IV.3.8 6 Ensayo GUS

Para llevar a cabo este ensayo, se procedió a tomar pequeños fragmentos de callos, que luego fueron incubados, en buffer fosfato (50mM NaH₂PO₄, pH 7) con el sustrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-acido glucoronico) a una concentración de 1mM. El ensayo, fue realizado en una placa de Elisa, cubierta con parafilm (para evitar su evaporación) a 37°C por una hora, luego del cual, se observó con la ayuda de un estereoscopio.

IV.3.8 7 Análisis por PCR de callos transformados

La totalidad de los callos GUS positivos fueron utilizados para extraer ADN utilizando el protocolo de extracción a mínima escala, para ello se cortaron pequeños fragmentos de callos y se procedió a moler cada callo en un tubo Eppendorf utilizando un punta de plástico estéril especial en 700 µl de solución de extracción compuesta por Tris-HCL 100mM (pH 8.0), EDTA 25mM , NaCl 1.4M, CTAB 2% (p/v) y Mercaptoetanol 0.2% (v/v). Se mezcló vigorosamente las fases. Posteriormente se centrifugo a 6000 rpm durante 15 minutos en una microcentrifuga, se transfirió el sobrenadante a otro tubo sobre el cual se agrego 0.5 volúmenes de NaCl 5M y se mezcló invirtiendo los tubos repetidamente. Se agregaron en este punto 2 volúmenes de Etanol 100% a -20°C y se mezcló por inversión suavemente, dejando en reposo a 4°C durante 30 minutos. Finalmente se centrifugo por 1 minuto a 6000rpm y el sedimento se seco y posteriormente se lavo con etanol al 70% nuevamente fue vuelto a centrifugar y secar, el sedimento final se resuspendió en 100µl de H₂O estéril. Para asegurar la integridad del material genético se analizo 5µl, en un gel de agarosa al 0.8% teñido con Bromuro de Etidio.

Se extrajo 15ng de este ADN y se procedió con la reacción de PCR con los iniciadores para el gen *skti-4* siguientes:

Iniciadores empleados:

soytry (forward) 5'-ATGAAGACACCATCTTCT-3'

soytryp(reverse) 5'-TCACTCACTGCGAGAAAG -3'

El programa de amplificación usado, fue el siguiente:

1 ciclo 1' a 94°C

35 ciclos 1' a 94°C

2' a 52°C

3' a 72°C

1 ciclo 7' a 72°C

El gen *skti-4* fue flanqueado con estos iniciadores complementarios a la secuencia líder y a la secuencia del péptido carboxi-terminal del gen *skti-4*. De forma que amplificara la secuencia completa de este gen que tiene un tamaño de 653pb .

El Mix empleado fue similar al empleado en IV.3.3.1 .Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% .

IV.3.8 8 Expresión de la GFP:

Para tratar evidenciar la expresión de la GFP, en los callos, fue necesario irradiar con luz UV dentro de una cámara de flujo laminar, para ello, se selecciono algunos callos que resultaron ser positivos al ensayo GUS y se pusieron a irradiar por 30 minutos.

IV.3.8 9 Análisis de datos

Para realizar el análisis de datos, se evaluó y cuantifico la totalidad de los callos formados, tomando en cuenta al explante que lo origina, así como su respuesta a la prueba GUS. Estos datos, nos sirvieron para calcular la efectividad de selección a 10 ppm de higromicina, (porcentaje de callos GUS positivos del total de callos obtenidos) y la frecuencia de transformación (porcentaje de explantes GUS positivos con respecto al total de explantes), (Cipriani. , 1999).

V. RESULTADOS

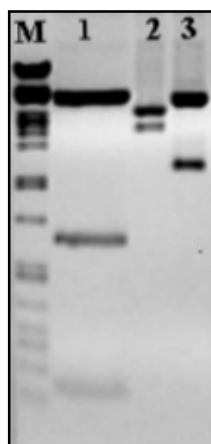
V.1 VERIFICACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS PLÁSMIDOS EMPLEADOS: pCIP-4 Y pKTI-2

V.1.1 Plásmido pCIP4

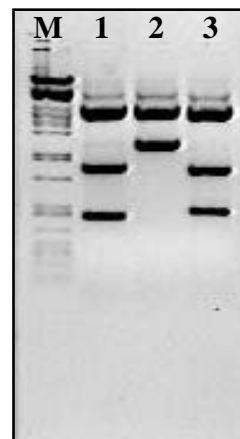
De acuerdo al mapa de restricción (Fig.3) al ser digerido el plásmido pCIP4, con las Enzimas *SphI* y *PstI*, se puede observar la existencia de tres bandas, (Fig. 15A), la primera, corresponde al vector pBA5 (4958pb), la segunda banda, correspondiente a parte del promotor de la β -amilasa (691pb) y la tercera corresponde a la caja TATA. Al ser digerido este plásmido, con las enzimas *EcoRI* y *SacI*, se puede notar dos bandas, la primera, corresponde al lo que queda del plásmido pCIP4 luego de la digestión con estas enzimas y la segunda corresponde al casete de la β -amilasa y al gen *wci-3*. Finalmente, al ser digerido este plásmido, con las enzimas *EcoRI* y *PstI*, se pueden ver también dos bandas, la primera, corresponde a lo que queda del plásmido pCIP4 (4470 pb), la segunda banda, correspondería a todo el promotor de la β -amilasa (1300 pb).

V.1.2 Plásmido pKTI-2

De acuerdo al mapa de restricción (Fig.4) al ser digerido el plásmido pKTI-2 (Fig. 15) con *SmaI* y *BamHI*, se puede observar tres fragmentos, el primero, correspondiente a lo que queda del plásmido pKTI-2 (2796pb) luego de ser digerida con estas enzimas, la segunda banda, corresponde al gen *skti-4* junto al 3'nos terminador (973pb), y la tercera banda, corresponde al promotor del virus del mosaico de la coliflor (35S). Al ser digerido, este plásmido, con las enzimas *PstI* y *BamHI*, se puede observar dos fragmentos, el primero, corresponde a lo que queda del plásmido pKTI-2 (2731pb) luego de ser digerida con estas enzimas. La segunda, corresponde al casete del promotor del virus del mosaico de la coliflor (35S) y el gen *skti-4* (1423pb). Al ser digerido este plásmido con la enzima *HindIII*, se obtiene tres fragmentos. El primer fragmento, corresponde al lo que queda del plásmido pKTI-2 luego de ser digeridos con estas enzimas. El segundo fragmento, corresponde a todo el promotor del mosaico de la coliflor (35S) y parte del gen *skti-4*, que nos da un tamaño de 942 pb. El tercer fragmento, corresponde a parte del gen *skti-4* y a parte del terminador 3'nos, que nos da un tamaño de 481pb.



(A)



(B)

Fig 15. Restricción de los plásmidos pCIP4 y pKTI-2 (A) Plásmido pCIP4 digerido con: 1) *SphI* y *PstI* 2) *EcoRI* y *SacI* 3) *EcoRI* y *PstI* (B) Plásmido pKTI-2 digerido con las enzimas: 1) *SmaI* y *BamHI* 2) *BamHI* y *PstI* 3) *HindIII*. Marcador λ /*PstI* (M).

V.1.3 Secuenciamiento de la caja TATA del promotor de la β -amilasa

Se realizó una lectura de los primeros 200 pb de la secuencia obtenida extremo 3' (Fig. 16) que son claramente distinguibles, esto nos permitió leer 124 pb entre los sitios de restricción *SphI* y *PstI* que teóricamente corresponde a la caja TATA (Yoshida et al., 1992).

V.2 OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pCIP36, pCIP37 Y pCIP38

V.2.1 Análisis de restricción

Se obtuvieron dos tipos de vectores binarios con el caset β Amy/*skti-4* uno en sentido (pCIP36) y el otro en antisentido (pCIP37) además de un pequeño plásmido que también contiene el caset en orientación

sentido (pCIP38) tal como demuestra los siguientes resultados de las diferentes digestiones enzimáticas realizados a estos plásmidos (se describe solamente los fragmentos visibles más importantes):

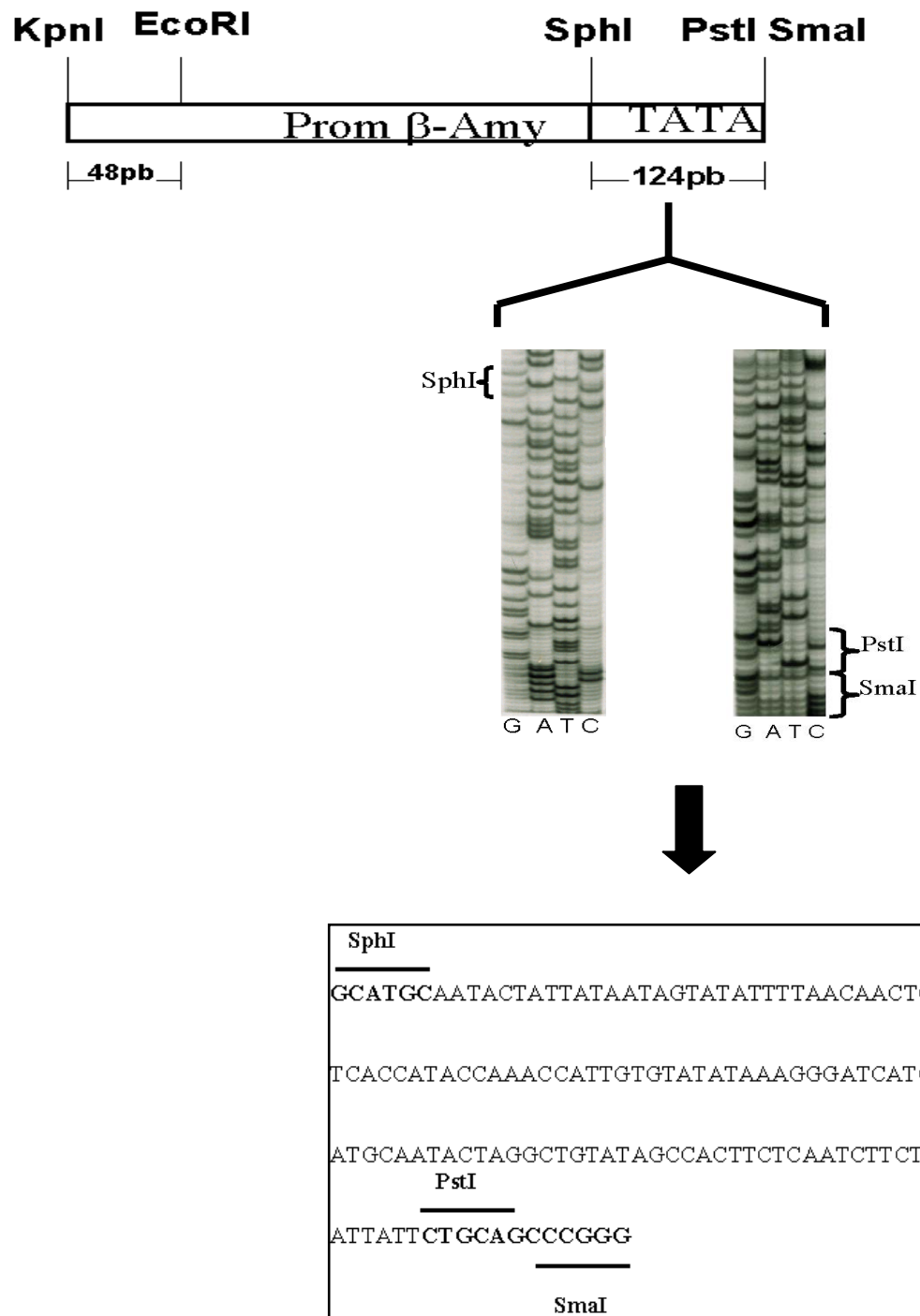


Fig. 16 Secuencia correspondiente ala caja TATA. Obsérvese los sitios de restricción *SphI* y *PstI* en el recuadro inferior, se observa la secuencia de la caja TATA.

- a) Para el caso del vector binario pCIP36 (Fig. 17A), al ser digerido con las enzimas *EcoRI* y *PstI*, se obtiene teóricamente 8 fragmentos, de los cuales solamente 5 fragmentos, son visibles, siendo el más importante, el tercero, que correspondea todo el promotor de la β -amilasa (1.3Kb). Cuando se realiza la digestión con las enzimas *SmaI* y *BamHI*, se obtienen 3 fragmentos, la segunda banda, corresponde a la mayor parte del promotor de la β -amilasa (1090pb), y la tercera banda, corresponde al gen *skti-4*, incluida el terminador NOS (974pb). Finalmente, al realizarse la digestión con la enzima *XhoI*, se obtuvo dos bandas, siendo la segunda la que corresponde al caset β Amy/*skti-4* (2.3 kb). Estos resultados coinciden exactamente con el mapa de restricción realizado para esta construcción (Fig.19)
- b) Para el caso del vector binario pCIP37 (Fig. 17C), al digerirse con las enzimas *EcoR* y *PstI* se obtiene 6 fragmentos visibles, de los cuales el segundo corresponde al promotor de la β -amilasa (1.3kb). Al ser digerido, con las enzimas *SmaI* y *BamHI*, se obtiene tres fragmentos, dentro de las cuales la segunda banda, corresponde a la mayor parte del promotor de la β -amilasa (1090 pb) y la tercera banda, corresponde al gen *skti-4* incluida el terminador NOS (974pb). Finalmente, al realizarse la digestión con las enzimas *Sall* y *KpnI*, se obtuvo dos bandas casi juntas, siendo la segunda, la que corresponde al caset β Amy/*skti-4* (2.3 kb) Estos resultados coinciden exactamente con el mapa de restricción realizado para esta construcción (Fig.20)
- c) Para el caso del plásmido pCIP38 (Fig 17B), al ser digerido con la enzima *EcoRI* y *PstI* se obtiene teóricamente 7 fragmentos, de los cuales solo 6, son claramente visibles, siendo el segundo fragmento el promotor de la β -amilasa (1.3kb). Al ser digerido con las enzimas *SmaI* y *BamHI*, se obtiene tres fragmentos, dentro de las cuales la segunda banda, corresponde a la mayor parte del promotor de la β -amilasa (1090 pb) y la tercera banda, corresponde al gen *skti-4* incluida el terminador 3'nos (974 pb). Finalmente, al realizarse la digestión con la enzima *Sall*, se obtuvo dos bandas casi juntas siendo la segunda la que corresponde al caset β Amy/*skti-4* (2.3 kb) Estos resultados coinciden exactamente con el mapa de restricción realizado para esta construcción (Fig.21)

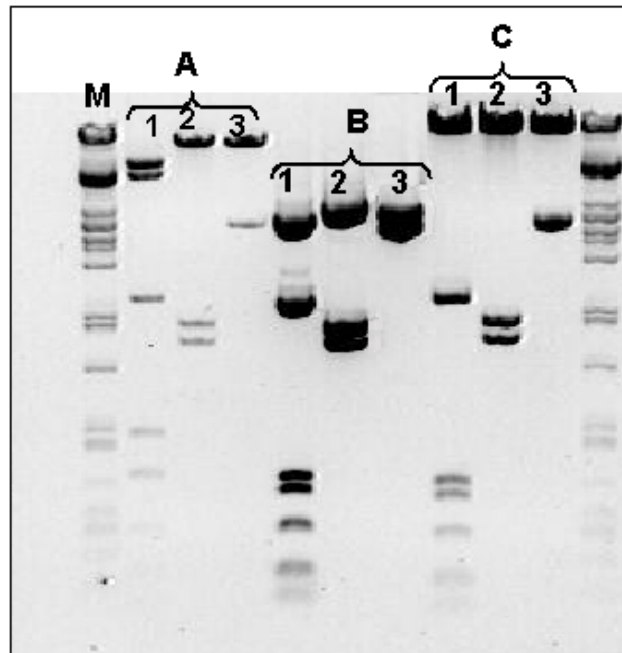
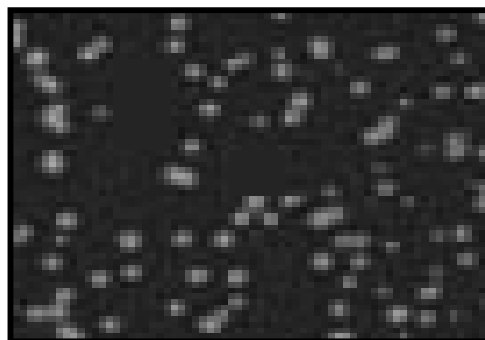


Fig. 17 Restricción de los plásmidos obtenidos **A)** pCIP36 con las enzimas (1)*EcoRI/PstI* (2)*SmaI/BamHI* (3)*XhoI* **B)** pCIP38 con las enzimas: (1)*EcoRI/PstI* (2)*SmaI/BamHI* (3)*SalI* **C)** pCIP37 con las enzimas: (1)*EcoRI/PstI* (2) *SmaI/BamHI* (3)*SalI/KpnI*.



A



B

Fig. 18 Expresión de los genes reporteros en *E.coli* **(A)** Expresión de la mGFP5 puntos blancos observadas bajo microscopio de fluorescencia OLYMPUS BH (1000X). **(B)** Expresión del gen GUSA.

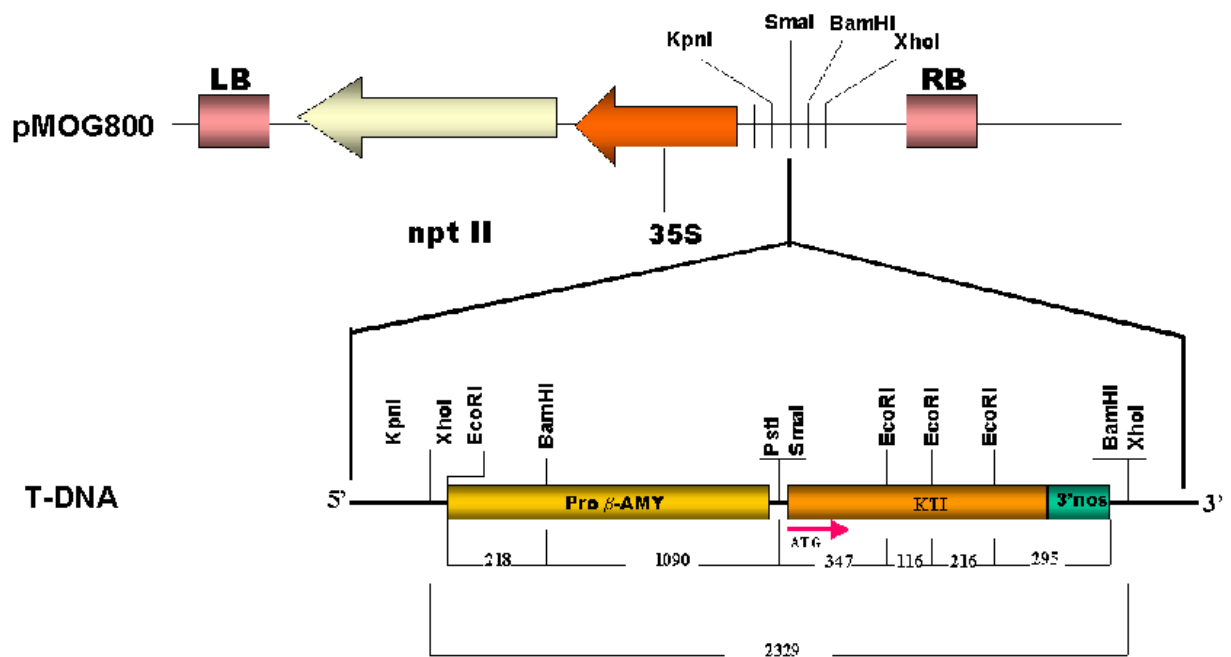


Fig. 19 Diagrama del T-DNA del vector binario pCIP36. LB, borde Izquierdo; RB, borde derecho; El diagrama inferior señala la posición del casete β -Amy/*skti-4* al ser insertado entre los sitios *KpnI* y *BamHI* del pMOG-800; *nptII*, gen de nopalina fosfotransferaza (*aph3'* II) (resistencia a Kanamicina); *skti-4*, inhibidor de tripsina de soja tipo Kunitz; 3'nos, terminador de la nopalina sintetasa; 35S, promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S; La dirección de la transcripción del gen *skti-4* señalada por la flecha debajo de este y por el codón de inicio ATG y también se muestran las principales enzimas de restricción así como las distancia en pares de bases entre ellas representados por los números de abajo

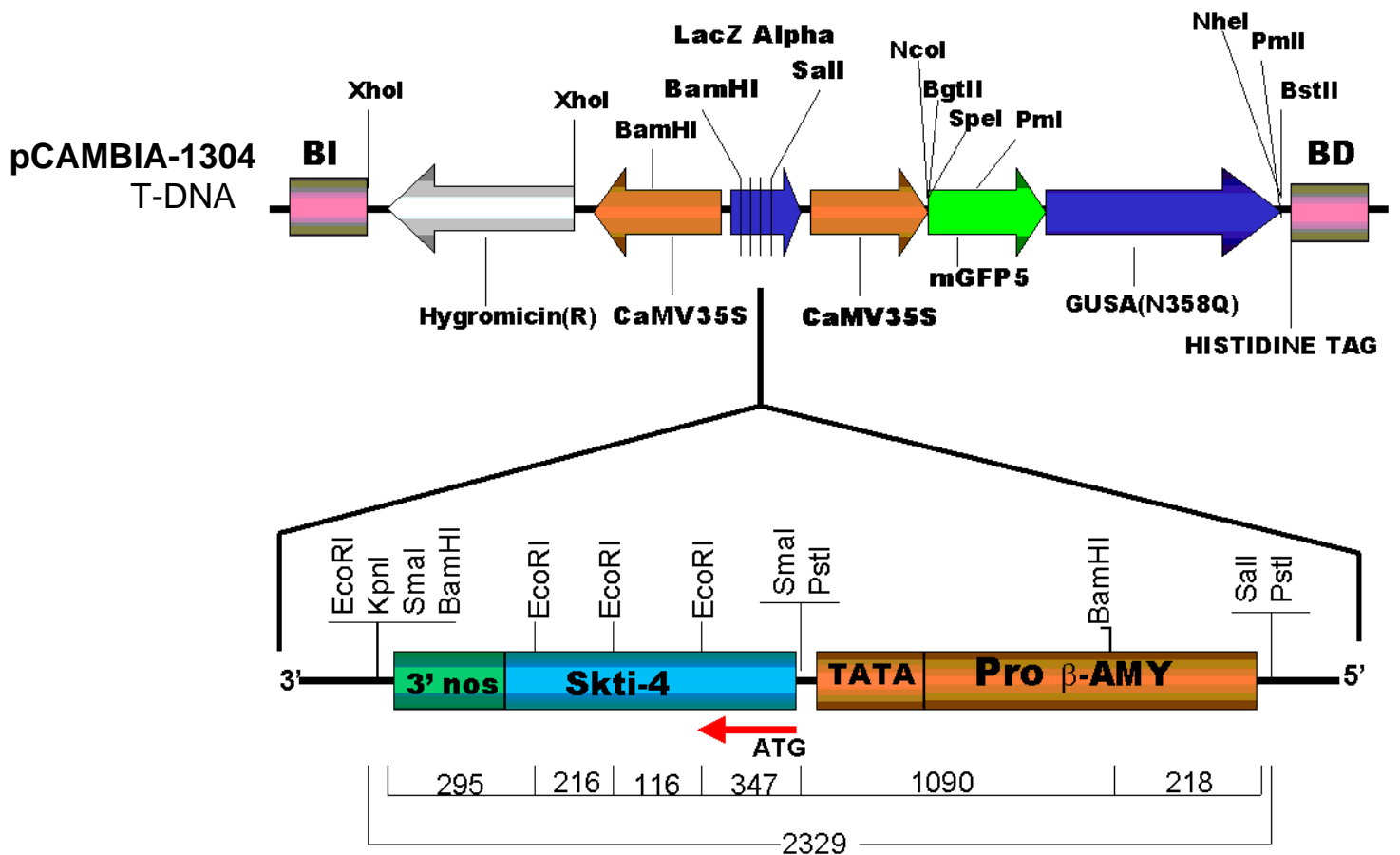


Fig. 20 Diagrama del T-DNA del vector binario pCIP37. LB, Borde Izquierdo; RB, borde derecho; El diagrama inferior señala la posición del casete β -Amy/*skti-4* insertado entre los sitios *Sall* y *BamHI* del vector pCambia-1304; hygromycin(R), gen de resistencia hptII (resistencia a higromicina); 35S, promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), mGFP5, una versión del gen de la proteína verde de fluorescencia; GUSA (N358Q), gen de β -glucoronidasa (gusAsta); Histidine Tag, cola de polihistidinas; *skti-4*, inhibidor de tripsina de soja tipo Kunitz; 3' nos, terminador de nopalina sintetasa. La dirección de la transcripción del gen *skti-4* esta señalada por la flecha debajo de este y por el codón de inicio ATG y también se muestran las principales enzimas de restricción así como las distancia en pares de bases entre ellas representados por los números de abajo.

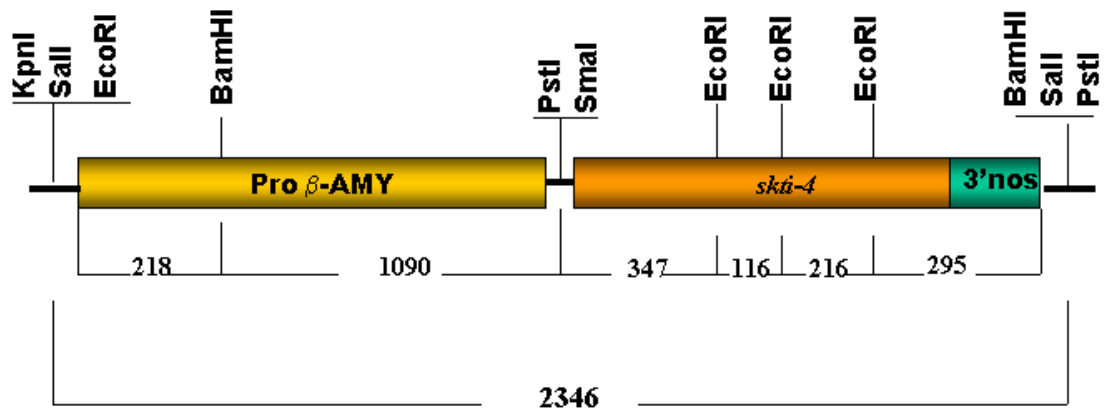


Fig. 21 Diagrama del T-DNA del vector pCIP38. El diagrama inferior señala la posición del casete β -Amy/*skti-4* al ser insertado entre los sitios *KpnI* y *BamHI* del plasmido pUC19; *skti-4*, inhibidor de tripsina de soja tipo Kunitz; 3'nos, terminador de la nopalina sintetasa; 35S, promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S.

V.2.2 Expresión de los genes reporteros mGFP5 y GUS_{Asta} en *E.coli*

Se logro observar la actividad de la mGFP5 en células de *E.coli* que mostraron fluorescencia verde bajo el microscopio (Fig.18A). También el gen GUSasta mostró una gran actividad tal como se observa el color azul intenso típico (Fig.18B)

V.3 TRANSFORMACIÓN DE *A.tumefaciens* CON LOS VECTORES pCIP36 Y pCIP37.

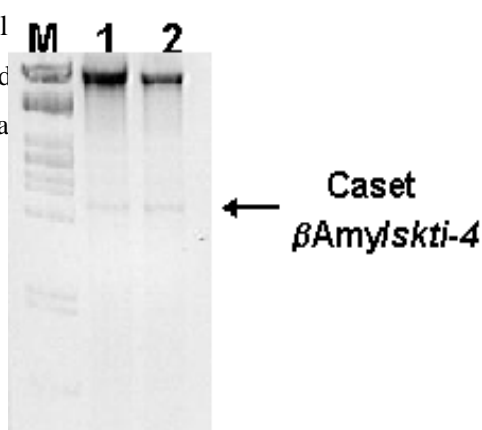
El análisis de restricción del plásmidos binarios, en *A.tumefaciens*, realizado mediante el uso de la enzima *XhoI* para pCIP36, y *Sall* y *KpnI* para el pCIP37 (Fig.22) nos permitió observar un fragmento claramente visible, que corresponde al caset β Amy/*skti-4* (2.3 Kb). Sin embargo, en el caso del pCIP37 se puede observar una banda inesperada alrededor de 1.6Kb que no se pudo precisar su origen inmediatamente. La pruebas de Southern Blot nos dio una clara señal para lugares donde se encuentra el caset β Amy/*skti-4* y también las bandas de mayor tamaño del marcador λ PstI (ver Fig. 23).

V.4 EVALUACIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN DE CAMOTE CON EL PCIP37.

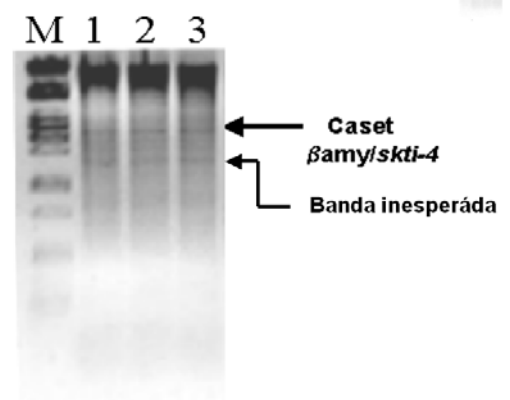
Se obtuvieron callos transgenicos tal como demuestra la prueba GUS y la evaluación mediante PCR aunque no hubo éxito en detectar la actividad de la GFP. Respecto al desarrollo de los explantes, después de 15 días de permanecer en el medio F9 (Fig 24A), estos, presentan los pecíolos hinchados en la zona distal. La aparición de callos con forma definida, y contables comienza a los 30 días (Fig.24B), con un promedio de 1 por explante, después de haberse iniciado el proceso de transformación, y encontrándose los explantes en el medio F9. El porcentaje de explantes, que formaron callos, fue de un 42% (Tabla 2). El resto del tejido, se tornaron necróticos y fenolizados. La totalidad de callos, viables, separados por su origen, proveniente de todos los pecíolos fueron traspasado al medio G24D, aquí, se pudo distinguir dos grupos de acuerdo a su aspecto:

1. Compacto de color amarillento o de verde a verde claro, y la superficie con grandes zonas cristalina (25%) (Fig.25A).
2. Friable o desmenuzable de color crema, y de apariencia esponjosa. (75%)(Fig.25B).

Los call
meses d
callos, a



enteron un rñido creciente, de tal forma, que des
fi
ibi



A

B

Fig. 22 Restricción de plásmidos obtenidos de *A.tumefaciens* (A) Plásmido binario pCIP36 sometidos a una digestión con la enzima *XhoI*. (B) Plásmido binario pCIP37 sometidos a una doble digestión con las enzimas *Sall* y *KpnI*. (M) marcador de pesos moleculares λ /*PstI*. En ambos se observa la banda que corresponde al caset β Amy/*skti-4* (2.3 Kb), aunque en el caso del plásmido pCIP37 se observa un fragmento inesperado debajo del caset.

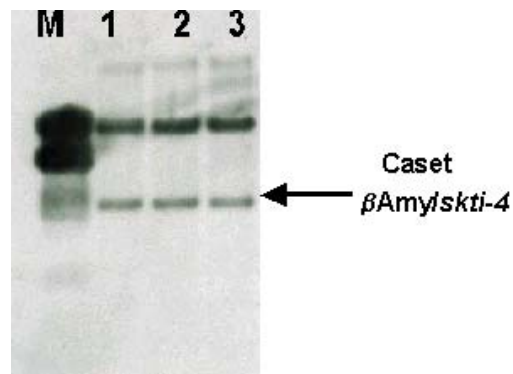


Fig. 23 Southern Blot del pCIP37. Observe la posición del casete del promotor del promotor de la β -amilasa y el gen *skti-4* (2.3 Kb) con respecto a las bandas del marcador λ /*PstI*. La transferencia, se realizo utilizando el gel mostrado en la figura 22 B



A



B

Fig. 24 Hojas del cultivar Tanzania mostrando los pecíolos hinchados a los 15 días en el medio F9 (A) y los callos después de 30 días, en el medio F9(B). Nótese la diferencia del callo que presenta un color amarillento y el resto del tejido necrosado.

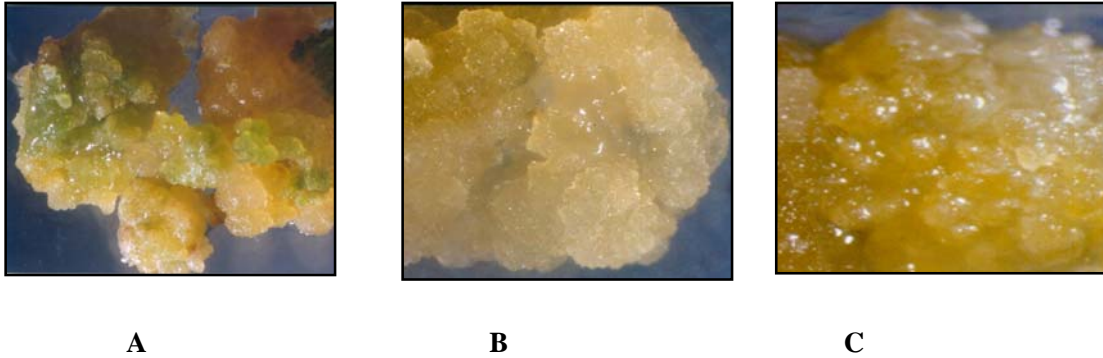


Fig. 25 Características mostradas por los callos obtenidos(10X). (A) Callo compacto de color verde a verde claro de superficie cristalina. (B) Callo Friable de color crema, y de apariencia esponjosa. (C) Callo embrionario

V.4.1 Ensayo GUS:

Se observó que en algunos de los callos sometidos a este ensayo presentan lugares azules pequeños dispersados en todo el callo, mientras que otros, presentan tejido azul rodeado de tejido seco y de color marrón oscuro (Fig. 27)

V.4.2 Expresión de la GFP:

Durante todo el proceso de búsqueda de fluorescencia, no hubo éxito, ya que no se observó fluorescencia, todos los callos, presentaban un aspecto pálido amarillento, bajo luz UV.

V.4.3 Evaluación de los callos transgénicos por PCR

Todos los callos GUS positivos fueron también PCR positivos. Algunas muestras del total se pueden observar en la figura 26.

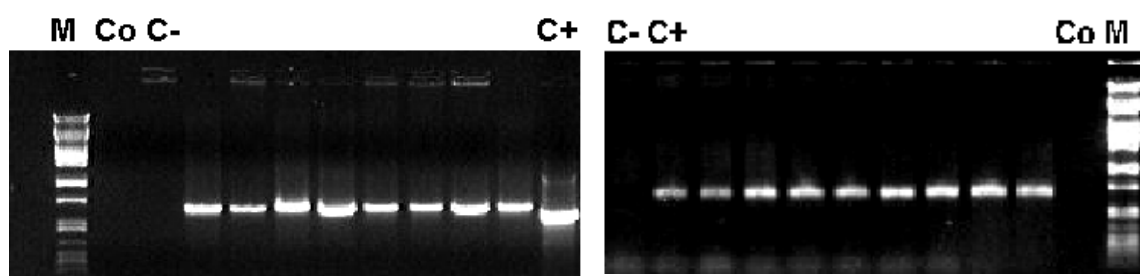
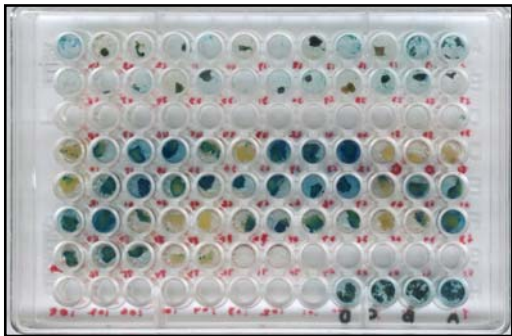
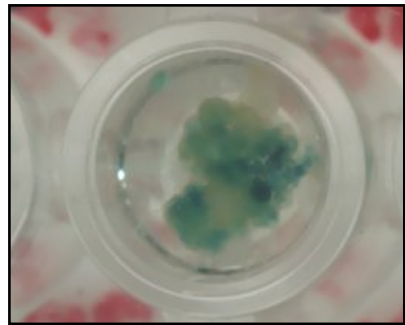


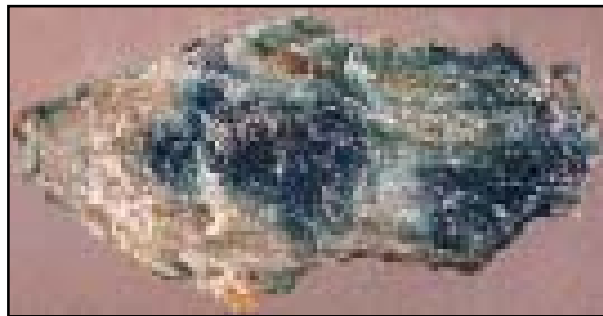
Figura 26. Amplificación por PCR de ADN de algunos callos putativamente transgénicos por PCR. Notase la ausencia de la banda en el control negativo (C-) control constituido por ADN geonómico de planta no transgénica y en (Co) constituido solo por el buffer sin muestra. Se puede observar la amplificación en las muestras control positivo (C+) constituido por ADN geonómico de planta transgénica. M marcador λ /PstI



A



B



C

Fig. 27 Ensayo GUS. Placa de Elisa conteniendo las muestras. **B.** Pozos mostrando callos positivos. **C** Callo mostrando las regiones GUS positivas.

V.5 ANÁLISIS DE DATOS

Los callos y explantes cuantificados están resumidos en la tabla 2

Tabla 2. Porcentaje de explantes que formaron callo, efectividad de selección y frecuencia de transformación

N.Exp	N.Exp con Callo	%Exp con Callo	N.call	N.call+	N.Exp con Callo+	Efec. De Selec	Fre. de Transf
212	89	42	214	139	68	65%	32%

N.Exps Numero de explantes.

N.Exp con Callo Numero de explantes que formaron callo.

%Exp.con Callo Porcentaje de explantes que formaron callo.

N.callo Numero de callos.

N.callo+ Numero de callos GUS+.

N.Exp.con callo+ Numero de explantes con callo GUS+.

Efec.de Selec. Efectividad de selección = porcentaje de callos.
GUS+ del total de callos obtenidos.

Fre. de Transf Frecuencia de transformación = Porcentaje de explantes que
formaron callo GUS+.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

VI.1 Caracterización de los plásmidos pCIP4 y pKTI-2

El plásmido pKTI-2, al ser digerido con las enzimas convenientes, mostró que se mantenían estable y los tamaños de los fragmentos, corresponden con los esperados de acuerdo al mapa de restricción. En el caso del plásmido pCIP4, también se encontraron los fragmentos esperados, solamente, en caso donde se realizo el corte con las enzimas *SphI* y *PstI*, la ultima banda, que teóricamente corresponde a la caja TATA, fue difícil de ser ubicado con precisión, de ahí surgió la necesidad de secuenciarlo. El secuenciamiento de la caja TATA, nos llevo a tener la seguridad de que el promotor de la β -amilasa, dentro del plásmido pCIP-4 empleado, se mantiene estable con 124 pb entre los sitios *SphI* y *PstI*, para la caja TATA tal como lo describe, Yoshida et al 1992. Esto sin embargo, contradice lo descrito por Espinoza, 1997, quien habría incurrido en un error al indicar el tamaño de la caja TATA como de 241 pb. De esta forma, el secuenciamiento, nos permitió confirmar con precisión el tamaño del fragmento correspondiente a la caja TATA, a diferencia de la corrida electroforética señalada anteriormente.

VI.2 Obtención de los plásmidos pCIP36, pCIP37

Pese a la diferencia de estrategias empleados en la construcción de los plasmidos pCIP36 y pCIP37 se logro lo mismo es decir unir el promotor de la β -amilasa con el gen *skti-4* formando el caset β -*amy/skti4* en diferentes orientacione ambos funcionales. La estrategia seguida para la construcción del pCIP36 fue mucho más rápida que la otra esto debido a dos razones uno que es dificultoso digerir productos de PCR con enzimas de restricción sin disminuir la eficiencia de la ligación. El segundo punto a considerar es la dificultad de clonar simultáneamente dos fragmentos en un plásmido ya que esto involucra dos procesos de ligación primero entre los fragmentos y luego en el vector además el tamaño de los fragmentos, a emplearse, es fundamental ya que a mayor tamaño de estos, es menor, la probabilidad de que extremos terminales de los ADNs puedan interactuar (Sambrook et al., 1989) . En el caso en que sé clono directamente en pCR-Script sé tubo que realizar una digestión al producto de PCR esto, en los extremos tiene una baja eficiencia dado que la enzima es una endonucleasa que necesita de ADN a ambos lados de su sitio de reconocimiento.

Respecto a la actividad del gen mGFP5 en el plásmido pCIP37, la fluorescencia observada bajo el microscopio de células de *E.coli*, fue la única evidencia de la su Actividad. Esto, difiere de otros tipos

de GFP, como la uvGFP que tiene una muy buena expresión en *E.coli* (Tsien., 1998) y se puede observar el aspecto verdoso, incluso a simple vista. La razón esta, en que la mGFP5, es una versión modificada de la GFP nativa. La mGFP5, tiene una secuencia (secuencia críptica) modificada para tener una mejor expresión en plantas (Hasselfold et al., 1997). Por otro lado la actividad del gen GUSAs fue muy buena.

Como se puede ver los plásmidos binarios pCIP36 y pCIP37 llevan ambos dentro del T-DNA el caset *βAmy/Skti4* por lo tanto podría considerarse comparar la ventaja de uno sobre el otro, sin embargo, esto solo se vera cuando se empleen estos vectores en experimentos de transformación de camote. En la presente tesis se eligió transformar camote con el vector pCIP37, por la facilidad que nos da los genes reporteros de este vector, permitiendo una rápida selección de los callos potencialmente transgénicos.

VI.3 Transformación de *A.tumefaciens* con los plasmidos pCIP36 y pCIP37.

Se logro la transformación de *A.tumefaciens*, con los plásmidos pCIP36 y pCIP37, tal como demuestra el análisis de restricción, además, de la evidente resistencia a la kanamicina (100 mg/l), que presenta las cepas transformadas. Esto, pese que en un inicio, en el caso de la restricción del plásmido pCIP37, se pudo identificar, una banda inesperada, ubicada entre 1700 pb y 1159 pb, que no fue visto en la restricción de pCIP36. Razón por la cual fue necesario realizar un Southern Blot que dio una clara señal con el caset *βAmy/Skti4* y ninguna con la banda inesperada, nos permitió, descartar procesos de recombinación inespecíficas. Sin embargo también se observa una fuerte señal a la altura del plásmido pCIP37, esto, era de esperarse ya que siempre es posible la presencia de plásmidos pCIP37, no digeridos y que conservan el caset. La presencia de una banda inesperada en el gel de agarosa, podría explicarse, por la gran cantidad de ADN utilizado en la restricción, que estaría permitiendo la visualización de fragmentos de ADN del plásmido Ti, que es muchas veces es un contaminante, cuando se utiliza el método de lisis alcalina, en la extracción de plásmido de *A.tumefaciens* (Slusarenko.,1995). La presencia de recombinaciones inespecíficas, así como la presencia de mas de un inserto en los plásmidos eleva el peso molecular de estos y disminuyen su eficiencia (Mozo y Hooykaas., 1991).

VI.4 Evaluación de la transformación de camote con el pCIP37.

El análisis de los datos de la efectividad de selección (82.2%) así como la frecuencia de transformación (38.7%) nos indica que vector binario pCIP37 es bastante eficiente para transformar camotes. Pero además nos indica también que la concentración de higromicina (10mg/l) utilizada así como el

procedimiento de transformación utilizado fue bastante aceptable. Estos resultados superan a lo reportado por Cipriani, 1999, para este mismo cultivar.

Las etapas de desarrollo, que comprende desde la infección con *A.tumefaciens*, hasta, la aparición de las plantas transgénicas fueron agrupadas en 6 etapas por Cipriani, 1999 de las cuales, se observan 2 de estas, en la presente tesis. Como se vio, hasta la evaluación final, estos callos, coinciden con las características, obtenidas por Cipriani para esta etapa. De todos los callos, el primer grupo descrito que constituye un 25%, tiene un gran potencial organogénico, por su apariencia compacta (Tapia et al, 1997). Aunque hay que señalar que en este mismo grupo, hay algunos callos, que tienen unas regiones blanquizas, que según algunos autores, fracasan durante la regeneración (Porobo et al, 1995). En el segundo grupo, están los callos friables (75%), que no tendrían mayor potencial organogénico, debido a que estos, a diferencia de los callos organogénicos, no presentan conglomerados de elementos traquéales ni puntos de iniciación, sino que más bien, presentan una disposición laxa con grandes espacios intercelulares, tal como fue reportado por Tapia et al, 1997 mediante microscopía electrónica. Por otro lado, la mayoría de los callos obtenidos, fueron de los pecíolos, esto podría explicarse, por la diferencia en la concentración endógena de reguladores de los distintos órganos de las plantas, que obedecen, además, de un gradiente en la concentración de auxinas, obedecería a la posible presencia de un factor, o compuesto difusible que estaría induciendo la diferenciación (Medina, 1991., Dessai et al, 1995., Padmanabhan et al, 2001). Hay que tener en cuenta que las auxinas, aparentemente, no solo tienen importancia en la formación de los embriones, sino también, en el siguiente evento de morfogénesis en el desarrollo embrionario (Padmanabhan et al., 1998). Sin embargo, también, existe un factor que podrían alterar la organogénesis, haciendo que el proceso se prolongue, este es el estado fisiológico de las hojas empleadas, ya que como se sabe, la presencia de fenoles asociados a la senescencia regula los niveles de determinadas auxinas, y de esta manera alteran el balance auxinas – citoquininas necesario para la caulogénesis (Dhir et al., 1998).

Respecto al ensayo GUS, además de haber permitido el análisis de datos, nos permitió realizar una temprana y rápida selección de los callos transformados. Es común que los callos GUS+, presenten diferentes aspectos ya que existe tejido no transformado, que puede ser restos del explante junto a tejido transformado, teniendo en cuenta, tal como lo reporta Medina en 1991, que los centros meristematicos se originan de las células de la corteza del pecíolo, y en el momento de la disección de los callos del explante, hay siempre la posibilidad de contaminar con células no transformadas que mas tarde se constituyen en el mejor de los casos en tejido muerto (por la actividad del agente de selección), de color marrón oscuro rodeando tejido azul (observado en el ensayo GUS) o en el peor de los casos, estos logran sobrevivir y regenerar en plantas y formar los conocidos “escapes”

Respecto a la evaluación de la GFP realizado pese a no contar con el equipamiento mínimo, adecuado y recomendado para poder observar la fluorescencia verde, en los callos obtenidos, como es un estéreo microscopio, con lámpara UV, y con los filtros adecuados para la longitud requerida: 395,475/509 (Steward., 2001) se realizó la búsqueda de actividad de la GFP encontrándose una pobre fluorescencia en algunos callos. La pobre fluorescencia de la mGFP5 en los callos, no solo podría deberse a la incapacidad de no poder ser detectado por la carencia del equipamiento necesario, sino que se puede ensayar varias hipótesis. Una de ellas, podría ser la actividad residual de *A.tumefaciens*, como es la fluorescencia endógena de células bacterianas presentes en los callos (Elliot et al, 1999) o el decaimiento (muerte), de una parte de las células bacterianas, o, por los compuestos producidos por las células de las plantas en respuesta al lisado bacteriano (Elliot., 1999) en estado latente, pese a la presencia de la al antibiótico Cefotaxime. Otra hipótesis, podría ser la auto fluorescencia, que se observa como puntos naranjas amarillentas, cuando el tejido blanco está bajo luz UV, es otro factor que puede afectar la fluorescencia, que no fue notada en el presente caso, pero sí, por otros autores como Lawton et al., 2000, en protoplastos de camote, que expresaban la GFP, aunque, este autor señala que la aparición de estas unidades naranjas amarillentas, sean probablemente, el resultado de una combinación, de la autofluorescencia roja, del cloroplasto, y la fluorescencia verde de la GFP. Lo mismo, fue observado por Haseloff et al.,1997, utilizando el gen *35s-mgfp4*. En el presente caso, y de todo lo anterior mencionado, podemos señalar que la hipótesis más cercana sería la actividad residual de las células de *A.tumefaciens* y la carencia del equipamiento mínimo requerido para este tipo de análisis.

VII CONCLUSIONES

1. Se han logrado construir dos vectores binarios: pCIP36, y pCIP37, que contienen la secuencia del gen *skti-4*, bajo el control del promotor de la β -amilasa de camote.
2. Obtuvo callos putativamente transgénicos, de la variedad Tanzania, utilizando para ello el vector binarios pCIP37. Tal como demuestra la prueba GUS y el análisis por PCR.
3. El vector binario pCIP37 puede ser utilizado en programas de producción de plantas de camote.
4. La metodología de transformación desarrollada, es una metodología eficiente, para la obtención de callos embriogénicos.
5. El gen GUS^{Asta}, constituye una herramienta valiosa, para identificar bacterias transformadas, y callos transgénicos en las etapas iniciales del proceso de transformación.

VIII RECOMENDACIONES

1. Continuar el desarrollo de otros vectores de transformación, que tengan genes inhibidores de proteasas, para utilizarlos en transformar, diferentes genotipos de importancia de camote, que sean posteriormente integrados a programas de manejo integrado de manejo de *Cylas ssp.*
2. Continuar con el proceso de embriogénesis, de los callos transformados con el plásmido pCIP37, hasta obtener plantas transgénicas de camote.
3. Realizar transformación genética, utilizando el plásmido pCIP36, y comparar la eficiencia de transformación con el plásmido pCIP37.
4. Evaluar y monitorear, la eficacia del promotor de la β -amilasa de camote, utilizando el gen reportero GUS_{Asta} y/o mGFP5, utilizando, los equipos recomendados.
5. Obtener y utilizar, otros promotores específicos de camote, en experimentos de transformación, a fin de optimizar la acción de algún gen de importancia.

IX REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ASHIS,K.A., DEBABRATA,B.,SAMPA, D and SOUMITRA,K.S. 1999.High level expression of soybean trypsin inhibitor gene in transgenic tobacco plants failed to confer resistance against damage caused by *Helicoverpa armigera*. Plant Molecular and Cellular Genetics,Bose Institute,P1/12,CIT Scheme VII-M, Calcutta 700054,India (www.ias.ac.in/jbiosci/december/article8.htm).
- AUSTIN, D.F. 1988, The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweetpotatoes and related wild species, in : Gregory P. (ed.). Exploración, maintenance, and utilization of sweetpotatoes genetic resources. CIP, Lima, Perú. pp.
- BLOCK,M. 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato(*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*.Theor.App.Genet 76:767-774.
- BABU,L.,NAMBISAN,B.1990.Biochemical constituents of sweetpotato.Second international training course on sweetpotato production. India pp 155-157
- CARELLI,M.L.D.,SKIRVIN,R.M.,HARRY, D.E.1992.Transformation and Regeneration Studies of Jewel Sweetpotato. SweetpotatoTechnology for the 21st Century : 53-59.
- CARROLL, S.B. and LAUGHON, A.S.1987.In DNA cloning: a practical approach (ed.D.Glover), Vol. III, pp. 89-111. IRL Press, Oxford.
- CIPRIANI, G.1999. Desarrollo de plantas transgenicas de camote (*Ipomoea batatas*) con inhibidores de proteinasas para incrementar resistencia a insectos. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae. 129 pág.
- CHALFANT,R.1990.Ecology and management of sweetpotato insects. AnnuRev Entomol.35:157-180.
- CISNEROS,F y ALCAZAR, J.2001.Manejo Integrado del Gorgojo del Camote o Tetuan del boniato, *Cylas formicarius* (Fab.),en Cuba.Centro Internacional de la Papa.
- CROWE,J.S., COOPER,M.A., SMITH,M.J.,SIMS,D.P and GEWERT.1991.Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) products after proteinase K digestion.Nucleic Acids Research 19:184
- DHIR,S.K.,OGLESBY,J.BHAGSARI,A.S.1998.Plant regeneration via somatic embryogenesis and transient gene expression in sweet potato protoplasts.Plant Cell Reports 17:665-669.

- DODDS,J.,MERZDORF,C.,ZAMBRANO,V. Y SIGUEÑAS,C.1991.Potential use of *Agrobacterium*-mediated gene transfer to confer insect resistance in sweetpotato.
- ESPINOZA, C.1997. Construcción de un vector de transformación vegetal conteniendo un gen inhibidor de quimi tripsina y el promotor de la β -amilasa de camote. Tesis de Biología. 61 pág.
- ELLIOT,A.R.,CAMPBELL,J.A., DUGDALE,B.,BRETTELL,R.I.S,GROFT,C.P.L.1999.Green-Fluorescent protein facilitates rapid in vivo detection of genetically transformed plants cell.Plant Cell Reports 18:707-714.
- FONSECA,C.,DAZA,M.,AGUILAR,C.,BEZENCON,N.,FANO,H.,GOYAS,H.,PRAIN,G.,RONCAL, H y TAFUR,S.1994.El camote en los Sistemas Alimentarios de la Yunga Norte del Perú. Centro Internacional de la Papa. Departamento de Ciencias Sociales. Documento de Trabajo N0 1994-4.pp.40.
- GAMA,M.,LEITE,R.P.,CORDEIRO,A.R.,CANTLIFE,D.J (1996).Transgenic sweetpotato plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation.Plant Cell,Tissue and Organ Culture 46:237-244.
- GELVIN,S.1990.Crow gall disease and hairy root disease: A sledgehammer and a tackhammer.Plant Physiol.92:281-285.
- GOSUKONDA, R.M.,PRAKASH,C.S and DESSAI,P.A.1995.Shoot Regeneration in vitro from Diverse Geotypes of sweetpotato and Multiple Shoot Production per Explant.HortScience 30(5):1074-1077.
- HARPER,B.K.,STEPHEN,A.M.STACI,M.L.,MATTHEW,D.H.,HAROLD,A.R.,KARI,A.M and STEWART,C.N,Jr.1999.Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants.Nature Biotechnology. Vol 17November 1999:1125-1129.
- HANSEN,G.and WRIGHT,M.S.2001Recent advances in the transformation of plants.Trends in plant Science.Reviews.
- HAJDUKIEWICZ,P., SVAB,Z. and MALINGA,P.1994.The Small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation.Plant Molecular Biology.25(6):989-994.
- HASELOFF,J and AMOS,B.1995.GFP in Plants.TIGAugust Vol.11No8

- HASELOFF, J., SIEMERING, D.R., PRASHER, D.C. and HODGE, S. (1997) Removal of cryptic intron and subcellular localisation of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 2122-2127
- HARUTA, M., MAJOR, M., CHRISTOPHER, J., CONSTABEL, P. (2001). A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. *Plant Molecular Biology* 46:347-359.
- HATTORI, T., YOSHIDA, N., NAKAMURA, K. 1989. Structural relationship among the members of a multigene family coding for the sweet potato tuberous root storage protein. *Plant Molecular Biology* 13:563-572.
- HILDER, V.A., GATEHOUSE, A.M.R., SHEERMAN, S.E., BARKER, R. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*. 330:160-163.
- HORISBERG, M., and TACCHINI-VONLANTHEN, M. 1983. Ultrastructural localization of Kunitz trypsin inhibitors on thin sections of soybean by the gold method. *Histochemistry* 77, 37-50.
- HORTON, D. (1987). Potatoes: production, marketing, and programs for developing countries. Westview, Boulder, Colorado.
- HOOYKASS, P., NAKAMURA, K. 1989. Transformation of plant cells via *Agrobacterium*. *Plant Molecular Biology*. 13:327-336
- ISHIGURO, S., NAKAMURA, K. 1992. The nuclear factor SP8BF binds to the 5'-upstream regions of three different genes coding for major proteins of sweet potato tuberous roots.
- JANSSON and RAMAN. 1991. Sweet potato Pest Management: a Global Overview. In: Sweet potato Pest Management: a Global Perspective. Jansson and Raman (eds.). Westview Press. p1.
- JEFFERSON, R.A. 1987. Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System. *Plant Molecular Biology Reporter*. Vol. 5 Num. 4 :387-405.
- JOFUKU, K.D. and GOLDBERG, R.B. 1989. Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plants. *Plant Cell* 1 (11), 1079-1093
- JOFUKU, K.D., SCHIPPER, R.D. and GOLDBERG, R.B. 1989. A frameshift Mutation Prevents Kunitz Trypsin Inhibitor mRNA Accumulation in Soybean Embryos. *The Plant Cell* . Vol. 1, 427-435.

- KENICHIRO,M;TSUTAE,T;KOJI,H;MIKIKO,A;ATSUSHI,M;ISHIGURO,S;NAKAMURA,K.2001.Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for β -amylase of sweet potato.Plant Molecular Biology 46:627-637.
- LAWTON ,R.,WINFIELD,S.,HANERY,D.BHAGSARI,A.S. and DHIR,S.K.2000.Expression of Green-Fluorescent Protein Gene in Sweet Potato Tissues. Plant Molecular Biology Reporter 18:139^a-139ⁱ.
- MANTIS,J. and TAGUE,B.W.2000.Comparing the Utility of β -glucoronidase and Green Fluorescent Protein for detection of Weak Promoter Activity in *Arabidopsis Thaliana*.Plant molecular Biology Reporter 18:319-330.
- MICAHUD,D.,&VRAIN,T.C.2001.Expression of Recombinant Proteinase Inhibitors in Plants.Methods in Biotechnology,vol.3:49-63.
- MICHAUD,D.,CATIN,L.,BONADE-BOTTINO,M.,JUANIN,L., and VRAIN,T.C.1996. Identification of stable plant cystatin/nematode proteinase complex using mildly denaturing gelatin/polyacrylamide gel electrophoresis.Electrophoresis 17:1373-1379
- MINGTANG,X.YUEHUI,H. and SUSHENG G.2001.Bidirectionalization of polar promoters in plants.Vol.19:677-679 (www.biotech.nature.com).
- MEDINA, L. 1991.Organogénesis “in vitro” a partir de Entrenudos, Raíces y Hojas de nueve Cultivares de Camote(*Ipomoea batatas* Lam.):Aspectos Hormonales e Histológicos Tesis de Biología 179 pág.
- MONTALDO, A. 1972. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. Grafica Pacific Press, Lima . 284 pág.
- MOZO,T.y HOOYKAAS, P.1991. Electroporation of megaplasmid into *Agrobacterium*. Plant Mol.Biol. 16: 917-918.
- McGAUGHEY,W.H and WHALON,M.E.1992.Maning Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins.Science.Vol.258 pp1451-1455.
- NEWELL,C.A.,LOWE,J.M.,MERRYWEATHER,A.,ROOKE,L.M.,HAMILTON,W.D.O.(1995)Transformation of sweet potato(*Ipomoea batatas*(L)Lam) whit *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin.Plant Science 107:215-227.

- NAKAMURA,K.1992. Regulation of expression of genes coding for sporamin and B-amylase of the sweet potato 21st century.Tuskegee University.PP.20-26.
- OTANI,M.,SHIMADA,T.,KIMURA,T.,SAITO,A (1998).Transgenic Plant Production from Embryogenic Callus of SweetPotato (*Ipomoea batatas*(L.)Lam)Using *Agrobacterium tumefaciens*.Plant Biotechnology 15(11),11-16.
- OTANI,M.,MASAHIRO.M and SHIMADA,T.1997.High Frequency Plant Regeneration From Leaf Calli in Sweet potato cv.Chugoku 25.Plant Tissue Culture Letters,13 (1),23-27
- OHTA,S.,SATORU ,M.,HATTORI,T and NAKAMURA,K.1990.Construction and Expression in Tobacco of a β -Glucoronidase(GUS) Reporter Gene Containing an Intron Within the Coding Sequence.Plant Cell Physiology.31(6):805-813
- OHTO,M.A and NAKAMURA,K.1995.Sugar-induced Increase of Calcium-Dependent Protein Kinases Associated with the Plasma Membrane in Leaf Tissues of Tobacco.Plant Physiology.109:973-981.
- OHTO,M.A., NAKAMURA,K.K and NAKAMURA, K.1992.Induction of Expression of Genes Coding for Sporamin and β -Amylase by Polygalacturonic Acid in Leaf-Petiole Cuttings of Sweet Potato.Plant Physiology.99:422-427.
- PADMANABHAN,K.,CANTLIFFE,D.J and KOCH,K.E.2001. Auxin-regulated gene expression and embryogenic competence in callus cultures of sweetpotato,*Ipomoea batatas* (L)Lam. Plant Cell Reports :187-192
- PADMANABHAN,K.,CANTLIFFE,D.J., HARRELL,D.B.and McCONNELL.1998. A comparison of shoot-forming somatic embryos of sweet potato(*Ipomoea batatas* (L)Lam.)using computer vision and histological analyses. Plant Cell Reports.17 :685-692.
- PHILIP,N.,BENFEY and NAM-HAI CHUA.1990.The Cauliflower Mosaic Virus Promoter:Combinatorial Regulation of Transcription in Plants.Science,Vol.250
- PRAKASH,C. , U. VARADARAJAN y A.KUMAR 1992. Genetic Transformation of Sweetpotato.Sweetpotato Technology for the 21st Century: 27-37.
- PRAKASH, C.S. 1994.Sweet Potato Biotechnology : Progress and Potential. Biotechnology and Development Monitor. 18: 18-20.

- QUAEDVLIEG,N.E.M.,SCHALAMAN,H.R.M., ADMIRAAL,P.C,WIJTING,S.E., STOUGARRD,J. and SPAINK,H.P.1998.Fusion between green fluorescent protein and β -glucoronidase as sensitive vital bifuncional reporters in plants.Plant Molecular Biology 38:861-873.
- RETY I.,CIPRIANI,G.,ZHANG,D.P, y MICHAUD,D.Soybean kunitz and Bowman-birk inhibitors stongly inactivate the major digestive serine proteinase of sweetpotato weevils.Annual Meeting of the American Society of Plant Physiology.(ASPP'98).From 27 June to 1July 1998.Madison,Wisconsin,USA.
- RYAN,C.1990.Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insect and phathogens.Annu.Rev.Phytophatol.28:425-449.
- RICHARDSON,M.1977.The Proteinase Inhibitors of Plants and Micro-Organism.Phytochemistry.Vol.16.pp159-169
- SAMBROOK,J.,FRITSH,E.F and MANIATIS,T.1989,Molecular Cloning :A laboratory Manual,x 3vol.Cold Spring Harbor Laboratory Press N.Y.
- SLUSARENKO, A. 1995. A rapid miniprep for the isolation of total DNA from Arobacterium tumefaciens. Plant Molecular Biology Report. 8(4):249-252
- STEWART,C.N.(Jr.).2001.The utility of green fluorescent protein in transgenic plants.Plant Cell Rep.20:376-382.
- STACI,L.,STEPHEN,A.,MABON and STEWART,N.1996.Tracking transgenic plants using green fluorescent protein.Department of Biology,University of North Carolina, Greensboro,NC 27412 (www.isb.vt.edu/brarg/brasym96/leffe196.htm).
- SONSINSKI,B; HE,L; CERVANTES-FLORES,R.M; POKRZYWA,A; BRUCKNER and YENCHO,G.C.2001. Sweetpotato:Germplasm Evaluation for Wound Healing Efficiency.Proceeding of the First International Conference on Sweetpotato Food and Health for the Future.Lima,Peru 26-29 July,2001.
- TAKEDA,S.,MANO,S.OHTO,M and NAKAMUR, K.1994.Inhibitors of Protein Phosphatases 1 and 2A Block the sugar-Inducible Gene Expression in Plants.Plant Physiology.Vol.106567-573.
- TAPIA,M.,WILCKENS,R y CAMPOS,L.1997.Regeneración y organogénesis in vitro de plantas de camote (*Ipomoea batatas* L.(LAM))presentes en Chile. Tesis de Ingeniero Agrónomo Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Castilla 537,Chilla, Chile.

- TING, Y. y A. KEHR. 1953. Mitotic studies in the sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). Journal of Heredity. 44: 207-211.
- TSIEN, R.Y.1998.The Green Fluorescent Protein.Annu.Rev.Biochem.67:509-544.
- YANG,F.,MOSS, L.G and PHILLIPS,G.N.1999.The Molecular Structure of Green Fluorescent Protein. Department of Biochemistry and Cell Biology and the W.M Keck Center for Computational Biology,Rice University ,Houston TX 77005-1892(www.bioc.rice.edu/Bioch/Phillps/Papers/gfpbio.html)
- YEH,K.W.,LIN,M.I.,TUAN,S.J.,CHEM,Y.M.,LIN,C.Y.,KAO,S.S.1997.Sweetpotato (*Ipomoea batatas*)trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*.Plant Cell Reports 16:696-669.
- YOSHIDA,N and NAKAMURA,K. 1991.Molecular Cloning and expression in *Escherichia coli* of cDNA encoding the subnit of sweet potato beta-amylase. Journal Biochem. 110(2), 196-201.
- YOSHIDA,N., HAYASHI, K and NAKAMURA,K. 1992.A nuclear gene encoding beta-amylase of sweet potato. Gene 120 (2), 255-259.
- VILLAREAL R., GRIGGS,D. 1982. Sweet Potato. Proceedings of the first international symposium. China pp.1-13
- WUY and SCHERAGA,H 1962.Studies of Soybean Trypsin Inhibitors.Physicochemical Properties.Biochem.,1,698.
- ZAMBRYSKI, P. 1992. Chronicles from the *Agrobacterium-plant* cell DNA transfer story. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 43:465-490.
- ZHANG DP,COLLINS WW,ANDRADE M. 1998 Genotype and fertilization effects on trypsin inhibitor activity in fertilization effects on trypsin inhibitor activity in sweetpotato.HortScience 33:225-228.
- ZHANG D.,GOLMIRZAIE A .,CIPRIANI G., PANTA A.,GHISLAIN M.,SMIT N.,RETY I .,y MICHAUD,D.1997.Developing weevil resistance in sweetpotato whit genetic transformation.International Potato Center .Program Report 1995-1996.Lima,Peru.

ANEXOS

ANEXO I: MEDIO DE PROPAGACION DE CAMOTE (MPB) Y SUPLEMENTOS

	1		50
<i>KTI3</i>	(1)	ATGAAGAGCACCATCTTCTTT---CTCTTTCTCTTTTGTGCCTTCACCAC	
<i>skti-4</i>	(1)	ATGAAGAGCACCATCTTCTTTGCTCTCTTTCTCTTTTGTGCCTTCACCAC	
Consens	(1)	ATGAAGAGCACCATCTTCTTTCTCTTTCTCTTTTGTGCCTTCACCAC	

(A)

	601		650
<i>KTI3</i>	(598)	CTTGATAAAGAATCACTGGCCAAGAAAAATCATGGCCTTTCTCGCAGTGA	
<i>skti-4</i>	(601)	CTTGATAAAGAATCACTGGCCAAGAAAAATCATGGCCTTTCTCGCAGTGA	
Consens	(601)	CTTGATAAAGAATCACTGGCCAAGAAAAATCATGGCCTTTCTCGCAGTGA	

	651
<i>KTI3</i>	(648) GTGA
<i>skti-4</i>	(651) GTGA
Consensos	(651) GTGA

(B)

Fig.31 Alineamiento del gen *KTI3* (Jofuko et al 1989) y el gen *skti-4* (Axis Genetic Ltd.1994) mediante el programa AlingX. En el recuadro (A), se puede observar la primera parte de las secuencias de ambos genes (en rojo), la secuencia consenso (en negro), mostrando el codon de inicio de lectura ATG (en azul) y el codon GCT(en recuadro amarillo) este ultimo, pertenece solamente al gen *skti-4*, y es la única diferencia entre ambos genes. En el recuadro (B), se puede observar las secuencias terminales de ambos genes, donde se destaca el codon de pare de lectura TGA (en azul). El coeficiente de identidad, entre ambos genes fue de **99.5%**

ANEXO II EXTRACCION DE PLASMIDOS DE E.coli Y OBTECION DE BACTERIAS RECOMBINANTES

Determinación de la temperatura de apareamiento, para amplificar el promotor de la β -amilasa (1.3 Kb), utilizando el termociclador en gradiente “Mastercycler gradient” (Eppendorf), con los siguientes iniciadores:

Soytryp (forward) 5'-GGGTCGACCCCGTACAAAGTATTAAACGTGC-3'
SalI

Betaami (reverse) 5'-GCCCCGGGCTGCAGAATAATGGAGA-3'
SmaI

Rango de temperas evaluadas en gradiente (48°C-76.7°C):

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
48	48.2	49.1	50.5	52.4	54.4	56.6	61.3	63.6	66.2	68.9	71.6	74	76.7

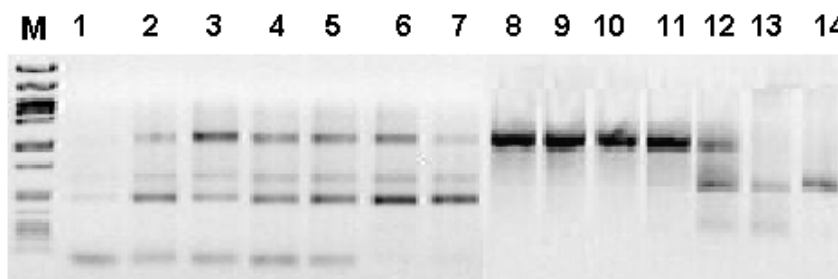


Fig.32 Análisis por gradiente de la temperatura optima de apareamiento de los iniciadores del promotor de la β -amilasa. Aquí se puede observar 4 temperaturas optimas (en negrillas).(*)Temperatura elegida (66.2°C)

Anexo III: SECUENCIAMIENTO DEL DNA SISTEMA fMOL (PROMEGA)

Extracción de ADN Plasmídico de *E.coli* (Método de Lisis Alcalina)

1. Sembrar una colonia en 5ml en el medio LB (Tabla 1), suplida con 100 mg/l de ampicilina, durante toda la noche a 37°C (16 h).
2. Pasar 5 ml del medio con bacterias, a un tubo eppendorf de 2ml, centrifugar a 14000 r.p.m. durante 5 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante, y resuspender en 200 µl de solución P1.
4. Agregar la solución P2, mezclar despacio, y dejar a temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Agregar 250 µl de la solución P3, mezclar despacio, y dejar 15 minutos en hielo.
6. Agregar 400 µl de Fenol: Cloroformo 1:1, mezclar con vortex por 30 segundos, y centrifugar a 14000 r.p.m por 5 minutos.
7. Recuperar la fase superior, pasar a otro tubo, y precipitar el DNA con 1ml de Etanol al100%.
8. Dejar 10 minutos a -70°C.
9. Centrifugar a 14000 r.p.m. por 10 minutos.
10. Descartar el líquido y agregar 1 ml de etanol al 70%.
11. Centrifugar a 14000 r.p.m por 5 minutos.
12. Descartar el líquido, dejar secar y resuspender en 20 µl de agua libre de nucleótidos o en TE.

Extracción de plásmidos purificados

Sistema “Minipreps”ADN Wizard Plus SV (PROMEGA).

Protocolo mediante centrifugación.

1. Tomar de 1– 10 ml de un cultivo bacteriano (*E. coli*), y centrifugar 5 minutos.
2. Resuspender el pellet, en 250 µl, de la solución de resuspensión.
3. Adicionar 250 µl de la solución de lisis, e invertir la mezcla 4 veces.
4. Adicionar 10 µl de la solución de proteasa alcalina, invertir 4 veces la mezcla. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Adicionar 350 µl de la solución de neutralización; Invertir la mezcla 4 veces.
6. Centrifugar a 14000 r.p.m. por 10 minutos
7. Insertar la columna de giro dentro del tubo de la colección.
8. Decantar, la fase clara obtenido en el paso 6, en la columna de giro.
9. Centrifugar, por 1 minuto, a temperatura ambiente. Descarta el flujo obtenido y reinsertar la columna dentro del tubo de la colección.
10. Adicionar 750 µl de la solución de lavado (con etanol previamente adicionado), y centrifugar por 1 minuto. Descarta el flujo, y reinsertar la columna en el tubo de colección.
11. Repetir el paso 10, con 250 µl de solución de lavado.
12. Centrifugar por 2 minutos a temperatura ambiente.
13. Transferir la columna de giro, a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml.
14. Adicionar 100 µl de Agua libre de nucleasas, a la columna de giro. Centrifugar por 1 minuto a temperatura ambiente.
15. Descartar la columna y guardar el DNA a -20°C.

Extracción de plásmidos de *A. Tumefaciens* (An et al, 1993)

1. Sembrar, 1 colonia de *A. Tumefaciens* en 5 ml de medio YM, suplementado con Kanamicina (100 mg/l) y Estreptomicina(100 mg/l), y dejar cultivado toda la noche a 28°C.
2. Pasar, 5 ml del medio con bacteria, a un tubo eppendorf de 2 ml, centrifugar a 14000 r.p.m. durante 5 minutos.
3. Eliminar, el sobrenadante, y resuspender en 150 µl de solución I (50 mM de glucosa, 10 mM de EDTA, 25 mM Tris HCL pH8.0 y 4 mg/l de Lysozima). Incubar 10 minutos, a temperatura ambiente.
4. Adicionar, 250 µl de soluciónII (1% de SDS y 0.2 N de NaOH). Mezclar, invirtiendo el tubo 4 veces, e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Adicionar, 30 µl de fenol alcalino (2 volúmenes de 0.2N NaOH y 1 volumen de fenol Tris Saturado) y mezclar con vortex suavemente.
6. Inmediatamente, adicionar 150 µl de Acetato de Sodio 3 M (pH 4.8). Mezclar por inversión e incubar a -20°C por 20 minutos.
7. Centrifugar, a 14000 r.p.m. por 5 minutos, y cuidadosamente coleccionar el sobrenadante.
8. Adicionar, 400 µl de fenol: cloroformo, y mezclar brevemente usando el vortex.
9. Centrifugar, a 14000 r.p.m. por 5 minutos, y coleccionar la fase superior.
10. Adicionar, 800 µl de Etanol al 96% helado, y mezclar por inversión
11. Centrifugar, a 14000 r.p.m por 10 minutos, y descartar el sobrenadante.
12. Lavar el Pellet obtenido, con 250 µl de Etanol frío al 70%, luego, colocar en un liofilizador por 5 minutos.
13. Resuspender, el Pellet 25 µl de Agua Sigma o TE
14. Almacenar a -20°C

Medio LB (Luria-Bertani Medium)

Par a un litro:

Agua desionizada 950ml

Bacto triptona 10g

Extracto de Levadura 5g

NaCL 10g

Ajustar el pH a 7.0 con 5N de NaOH. Autoclavar a 15 lb/sq

* En el caso de emplear medio sólido, utilizar 15 g/l de Agar, y dispensar en placa.

Solución P1 (Lísis Alcalina)

0.2MnOH 20ml 1N NaOH

1% SDS 10ml 10%SDS

Completar a 100 ml, con agua destilada, y autoclavar. Antes de usar agregar 4 mg/ml de lisozima.

Solución P2 (Resuspensión de Células)

0.05M Tris-HCL pH 7.5

5ml de 1N Tris -HCL pH 7.5

0.01M EDTA

2ml de 0.5N EDTA

Completar a 100 ml con agua destilada.

Solución P3 (Solución de Neutralización)

2.55 M Acetato de Potasio a pH 4.8

Pesar 25.03 g de Acetato de potasio, y adicionar a 100 ml de agua destilada.

Buffer TE

0.01M Tris-HCl, pH 8 1ml de 1M
0.001M de EDTA 200µl de 0.5M
Completar a 100 ml con agua destilada. Autoclavar.

NaOH 1N : 4 g/100 ml, pH 8 (autoclavar)

SDS 10%: 10 g/100 ml (no autoclavar)

Tris –HCl (1M): 12.1 g/100 ml , pH 8 (autoclavar)

EDTA (0.5M): Sal bi-sódico de EDTA 9.3 g/100 ml, llevar a pH 8, usando NaOH en pastillas.

KOAc (2.55M): 25.03 g/100 ml, llevar a pH 4.8

Buffer TBE (10X)

Tris base 108g
Ácido bórico 55g
EDTA (0.5M) 40ml
Completar a 1 litro con agua destilada. Autoclavar

Medio LB

Triptona 20 g
Extracto de Levadura 10 g
Cloruro de Sodio 10 g
Completar a 1 litro con agua destilada. Llevar a pH 7.2-7.4 con NaOH. Autoclavar.

Medio YM (Yeast-Mannitol GIBCO-BRL) (1 L)

Manitol 10 g
Extracto de Levadura 0.4 g
NaCl 0.1 g
Sulfato de Magnesio heptahidratado 0.2 g
Fosfato dibásico de potasio 0.5 g
Agarosa* 15 g

*Solo si es medio semi-sólido

Ajustar el pH a 7.0 con 5 N de NaOH. Autoclavar a 15 lb/sq

Preparación de Antibióticos

Ampicilina (100000mg/l)

Disolver 1 g en agua destilada hasta completar un volumen de 10 ml y esterilizar por filtración.
Mantener a –20°C.

Kanamicina (100000mg/l)

Disolver 1 g en agua destilada hasta completar un volumen de 10 ml y esterilizar por filtración.
Mantener a –20°C.

Estreptomicina (100000mg/l)

Disolver 1 g en agua destilada hasta completar un volumen de 10 ml y esterilizar por filtración.
Mantener a –20°C.

Preparación del X-GAL (20,000 p.p.m)*

Disolver 20 mg de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactosido) en 1ml de Dimetilformamida y almacenar en un envase oscuro a -20°C . No es necesario esterilizar por filtración

Preparación del IPTG (200,000 r.p.m)*

Disolver 2 g de IPTG (Isopropylthiol- β -D-galactosidasa), en 10 ml de agua destilada. Esterilizar mediante filtración. Almacenar a -20°C .

* A una placa LB con antibióticos, agregarle 40 μl de solución Stock de X-gal y 4 μl de la solución stock de IPTG.

ANEXO IV: DETERMINACION DE LA TEMPERATURA DE APAREAMIENTO DE LOS INICIADORES PARA AMPLIFICAR EL PROMOTOR DE LA β -AMILASA

A) *Escherichia coli* (Ref.:Bio-rad manufacturer)

1. Inocular en 1litro de medio LB (sin Antibiótico), 10ml de un cultivo fresco de *Escherichia coli*.
2. Hacer crecer las células a 37°C bajo movimiento vigoroso y continuo, hasta, alcanzar una densidad óptica a 600nm (DO^{600}) de 0.5-0.8 (los mejores resultados se obtienen con células que crecen rápidamente, por lo tanto, la densidad depende de la línea y las condiciones de crecimientos)
3. Para cosechar, enfríe el frasco en hielo por 15–30 min. Y centrifugar en un rotor frío a 4000 g por 15 minutos (5000rpm en GS3). Los rotores a usar, son J14 y J 20. Es importante contrapesar los tubos.
4. Resuspender los pellets, en un total de 1 litro de agua milli-Q estéril fría. Centrifugar de la misma forma que el caso anterior (*id*)
5. uspender, en 0.5 litros de agua milli-Q estéril fría. Centrifugar *id*
6. Resuspender, en 20 ml de glicerol al 10% estéril fría. Centrifugar
7. Resuspender, a un volumen final de 2-3 ml de glicerol estéril frío al 10%.La concentración debería ser al menos de 3×10^{10} .
8. Esta suspensión, debe ser congelada en alícuotas (40 μ l), en nitrógeno líquido y almacenada a -70°C . Las células con estas condiciones, son buenas al menos por 6 meses.

B) *Agrobacterium tumefaciens* (Cangelosi et al., 1991)

1. Inocular en 1litro de medio YM (sin Antibiótico), 1ml de un cultivo fresco de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404.
2. Hacer crecer las células a 28°C, bajo movimiento vigoroso, y continuo (200 r.p.m), hasta, alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO^{600}) de 0.4-0.6
3. Dividir en 4 tubos de 50 ml, y centrifugar a 10,000 r.p.m a 4°C por 10 minutos.
4. Resuspender, cada sedimento en 10 ml del tampón I frío (HEPES 1 mM pH 7.0), y se volvió a centrifugar.
5. Centrifugar a 10000 r.p.m a 4°C por 10 minutos.
6. Resuspender, cada sedimento en 10 ml del tampón II (HEPES 1mM pH 7.0, glicerol 10%), y volver a centrifugar de la misma forma, que en los casos anteriores.
7. Resuspender, cada sedimento en 0.5 ml del tampón II refrigerado, y convinar todas las células en 2 tubos Eppendorf. Luego, Centrifugar a 10,000 r.p.m a 4°C por 5 minutos.
8. Resuspender, cada sedimento en 200 μ l del tampón II frío.
9. Almacenar las células a -70°C

Medio SOC (1 L)

Agua desionizada	950 ml
Bacto Triptona	20 g
Extracto de Levadura	5g
KCl (250mM)	10 ml
MgCl ₂ (2M)	5 ml
Glucosa(1M)	20ml
Ajustar a pH7.0 con NaOH 5N. Autoclavar a 15 lb/sq	

Anexo V: Southern Blot

1. Solución de depurinación

HCl 250 mM

2. Solución de Denaturación

NaCl 1.5 M

NaOH 0.5 M

3. Solución de Neutralización

NaCl 1.5 M

Tris-HCl 0.5 M

pH=7.5

4. -Buffer de Lavado Primario (1L)

Urea 120 g 2 M

SDS 1 g 0.1 %

0.5 M de fosfato de Na (pH=7) 100 ml* 50 mM

NaCl 8.7 g 150 mM

1.0 M MgCl₂ 1 ml 1 mM

Blocking reagent 2 g 0.2%

*Ajustar el pH con Hidroxido de Sodio.

5.-Buffer de Lavado Secundario (Stock 20X) (1L)

Tris -Base 121 g 1 M

NaCl 112 g 2 M

Ajustar el pH a 10. Este puede estar almacenado por 4 meses a 2-8°C

6.-Buffer de Lavado Secundario (Solución de Trabajo)

Diluir, la solución Stock (20X) 1:20 y, adicionar 2 ml de MgCl₂ 1 M, para dar una concentración final de 2 mM de magnesio en el Buffer. Esta solución, no debe ser almacenada.

Anexo VI: EXTRACCION DE PLASMIDOS DE *A.tumefaciens* Y OBTENCION DE BACTERIAS RECOMBINANTES

Preparación de las placas de vidrio

Para poder realizar la corrida electrofética, es necesario preparar los vidrios, donde, se podrá preparar el gel de poliacrilamida. Por esto, cada vidrio será tratado de la siguiente forma:

A.- Vidrio pequeño

El vidrio pequeño, debe de ser tratado con una solución adherente fresca, que nos permita adherir en el gel de poliacrilamida al vidrio

1. Adherir, con la ayuda de un papel tissue, agrega la solución de adhesión (4.5µl de Bind Silano y 4.5 µl de ácido acético glacial en 1.5 ml de alcohol al 95%), a un vidrio previamente limpiada con alcohol, asegurándose, que este completamente cubierta.
2. Después de 5 minutos de la aplicación, remover, los restos de la solución de adhesión con el mismo tipo de papel, pero, empapado con alcohol al 95%. La limpieza debe de ser echa, sin mucha presión, para evitar remover el silano y el gel no podría adherirse.
3. Dejar secar, a temperatura ambiente, durante 1 hora.

B.- Vidrio Grande

El vidrio Grande, debe de ser tratado con una solución repelente fresca, que nos permita adherir, el gel de poliacrilamida, al vidrio. Se puede para ello, utilizar una solución comercial exclusivamente para esto, o en su defecto, puede ser reemplazado por un limpia vidrios llamado Rain X.

1. Adherir, con la ayuda de un papel tissue, la solución de repulsión (Rain X) a un vidrio previamente limpiada con alcohol, asegurándose que este lo cubra completamente.
2. Después de 10 minutos, de la aplicación, remover los restos de la solución de repulsión, con el mismo tipo de papel, pero, empapado con alcohol al 95%. La limpieza, debe de ser echa sin mucha presión. Un exceso de Rain X puede inhibir la tincion.
3. Dejar secar a temperatura ambiente, durante 1 hora.

Preparación del gel de Secuenciamiento

1. Colocar, los espaciadores laterales, sobre el vidrio grande, y sobre este colocar el vidrio pequeño.
2. Asegurar, con unos ganchos metálicos, para que, nos dé una presión adecuada, esperando, que no se formen rendijas por donde pudiese drenar gel.
3. Colocar, los peines en la parte superior, estos deben de ingresar con facilidad sin estar ni muy flojos ni muy ajustados. Para lograr esto, se puede hacer uso e otros ganchos metálicos.
4. Preparar el gel, de poliacrilamida de la siguiente forma: Tomar 60 ml de una solución de acrilamida al 6%, adicionar una solución 33 µl de TEMED, y 330 µl de APS al 10% (persulfato de amonio), agitar suavemente. Retirar el peine del vidrio, levantar por una esquina el vidrio, y verter la acrilamida suavemente para evitar la formación de burbujas.
5. Una vez acabado de llenar el espacio entre los dos vidrios “sándwich”, colocar el peine con el lado recto hacia adentro, entre las dos placas de vidrio. Dejar los restos de acrilamida no empleada, sobre el peine, para que al polimerizar el gel no se contraiga demasiado.

Armado del Gel en la cámara de electroforésis

Una vez terminado los pasos anteriores, se proceden a colocar e gel, dentro de la cámara de electroforésis vertical (Modelo S2, GIBCO), que contiene en el tanque inferior 400 ml de tampón TBE 1 X, y en el superior 600 ml de tampón TBE 0.5 x. Para ello, previamente, se sacan los ganchos de vidrio y el peine y espaciador inferior, y se limpia con agua, el espacio entre las dos

placas, con la finalidad de retirar los restos del gel introducidos. Se procede a colocar, el gel, con la placa pequeña mirando hacia la cámara. Se procede, a eliminar, las burbujas que se forman con la ayuda de una aguja hipodérmica.

Armado de la reacción de secuenciamiento

1. Marcar cuatro tubos para PCR (G, A, T, C), y a cada uno, añadir 2 µl de la respectiva mezcla de d/ddNTP. Cubrir y guardar a 4°C.
2. En otro tubo mezclar:

ADN molde (plásmido pPCR-Script)	2 µg
Tampón de secuenciamiento 5 X	5 µl
Iniciador pUC/M13 “reverse”	4.5 pmol
Agua libre de Nucleasas c.s.p	16 µl
Taq ADN polimerasa (5 U/µl)	1 µl
3. Adicionar, 4 µl de la mezcla anterior, a cada uno de los tubos del paso anterior.
4. Cubrir, cada tubo, con aceite mineral (25 µl).
5. Colocar, los tubos, en el termociclador, el cual ha sido previamente pre-calentado a 95°C, y correr el siguiente programa:

95 °C por 30 segundos (denaturación)
42 °C por segundos (apareamiento)
70 °C por 1 minuto (síntesis)
4 °C hasta retirar los tubos

6. Después, de que el programa ha terminado, añadir 3 µl de la solución para detener la reacción de secuenciamiento, a cada tubo, de reacción.
7. Denaturar a 95 °C, durante 5 minutos, y cargar 4.5 µl de cada reacción en el gel de poliacrilamida.

Anexo VII: TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CAMOTE

Medio	Composición	Concentración
F15	Sales MS Vitaminas MS 2,4D Zeatina Ribosido Sucrosa pH 5.8	0.2 mg/L 0.2 mg/L 30 g/L
F9	Sales MS Vitaminas MS Zeatina Ribosido Sucrosa pH 5.8	0.2 mg/L 30 g/L
G24D	Sales MS Vitaminas MS 2,4D Acido Giberelico Sucrosa pH5.8	0.05 mg/L 0.1 mg/L 30 g/
MPB	Sales MS Vitaminas MS Acido Giberelico Acido Nicotinico Tiamina Piridoxina-HCl Glicina Sucrosa pH5.8	0.010 mg/L 0.150 mg/L 0.120 mg/L 0.150 mg/L 0.600 mg/L 30 g/L
Vitaminas MS	Acido Nicotinico Thiamina Piridoxina-HCL Glicina Myoinositol	0.5 mg/L 0.1 mg/L 0.5 mg/L 2 mg/L 100 mg/L

Las Sales MS se usan a 4.3 g/L

Sales Inorgánicas MS (Murashige and Skoog)

Macronutrientes

Nitrato de Amonio	1,650 mg/L
Cloruro de Calcio anhidro	332.02 mg/L
Sulfato de Magnesio anhidro (MgSO ₄)	180.70 mg/L
Nitrato de Potasio (KNO ₃)	1900.00 mg/L
Fosfato de Potasio Monobasico (KH ₂ PO ₄)	170.00 mg/L

Micronutrientes

Acido Bórico (H ₃ BO ₄)	6.20 mg/L
Cloruro de Cobalto anhidro (CoCl ₂)	0.014 mg/L
Sulfato de Cobre anhidro (CuSO ₄)	0.016 mg/L
Na ₂ EDTA	37.25 mg/L
Sulfato de Manganeso (MnSO ₄ .H ₂ O)	16.90 mg/L
Acido Molibdico (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	0.25 mg/L
Ioduro de Potasio (KI)	0.83 mg/L
Sulfato Ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27.80 mg/L
Sulfato de Zinc (ZnSO ₄ .H ₂ O)	5.37 mg/L

Concentrado de hormonas y antibióticos

Acido dicloro-fenoxiacetico (2,4D) (1000 ppm):

Disolver 5 mg de 2,4 D, en unas gotas de etanol absoluto. Añadir agua milliQ hasta completar 5 ml. Ajustar el pH entre 6 –7 con NaOH. Esterilizar por filtración, y dispensar en viales de 1 ml. Almacenar a –20°C.

Zeatina Ribosido (Zea) (1000 ppm):

Disolver 5 mg, con unas gotas de 1N NaOH. Añadir agua milliQ, hasta completar 5 ml. Esterilizar por filtración. Dispensar en viales de 1ml. Almacenar a –20°C.

Acido Giberelico (GA3) (1000 ppm):

Disolver 5 mg, con unas gotas de 1N NaOH. Añadir agua milliQ hasta completar 5 ml. Esterilizar por filtración. Dispensar en viales de 1ml. Almacenar a –20°C.

Acetosiringona (3',5'- Dimethoxy-4'-hydroxy –acetophenone FW=196.2):

Disolver 500 mg de polvo, en 20.4 ml de dimetil-sulfoxido (DMSO), para preparar un concentrado 0.1 M.

Guardar a 4°C, en envases cubiertos con papel de aluminio. Se usan 2 ml del concentrado para 1L de medio. La concentración final es de 200 µM.

Thiamina HCL (vitamina B1) (1000 ppm):

Disolver 10 mg de polvo, en 10 ml de agua milliQ. Esterilizar por filtración. Dispensar en viales. Conservar a –20°C.

Piridoxina-HCl (vitamina B6) (1000 ppm):

Disolver 10 mg de polvo en 10 ml de agua milliQ. Esterilizar por filtración. Dispensar en viales. Conservar a -20°C .

Acido Nicotínico (Niacina) (1000 ppm):

Disolver 10 mg de polvo en 10 ml de agua milliQ. Esterilizar por filtración. Dispensar en viales. Conservar a -20°C .

Glicina (Aminoácido) (1000 ppm):

Disolver 10 mg de polvo en 10 ml de agua milliQ. Esterilizar por filtración. Dispensar en viales. Conservar a -20°C .

Higromicina (100,000 p.p.m)

Disolver 1 g en agua destilada hasta completar un volumen de 10 ml y esterilizar por filtración. Mantener a -20°C .

